Aus dem Institut für Wissenschaftliche Mikroskopie
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Haselmann

---

# Die Beeinflussung der Brechzahlverhältnisse biologischer Objekte durch Phosphorwolframsäure bzw. Phosphormolybdänsäure

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eckhard Gilch
aus Albershausen
1980

Aus dem Institut für Wissenschaftliche Mikroskopie
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Haselmann

---

# Die Beeinflussung der Brechzahlverhältnisse biologischer Objekte durch Phosphorwolframsäure bzw. Phosphormolybdänsäure

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eckhard Gilch
aus Albershausen
1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Haselmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Drews

# INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| A. | EINLEITUNG | 1 |
| | 1. Historische Übersicht über die Verwendung der Phosphorwolframsäure bzw. Phosphormolybdänsäure | 1 |
| | 2. Ergebnisse allgemeiner historischer Untersuchungen an PWS bzw. PMS | 6 |
| B. | VORAUSSETZUNGEN | 9 |
| C. | FRAGESTELLUNG | 12 |
| D. | ALLGEMEINES | 15 |
| E. | MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| | 1. Meßobjekte | 16 |
| | 2. Methoden zur Brechzahlbestimmung | 20 |
| | 3. Versuchsanordnungen | 24 |
| F. | AUSWERTUNG | 42 |
| | 1. Umrechnung der Brechzahlen der Gelatine auf gleiche Ausgangswerte | 42 |
| | 2. Umrechnung der Ergebnisse von Wellenlänge 589 nm auf 546 nm | 42 |
| | 3. Meßwerte | 44 |
| G. | ERGEBNISSE | 45 |
| | 1. Physikalische Eigenschaften von PWS bzw. PMS | 45 |
| | 2. Optische Dichte | 48 |
| | 3. Vorversuche zur Messung der Brechzahl | 49 |

Seite

G. 4. Einflüsse verschiedener Behandlungsmethoden auf die Brechzahl von Stoess-Gelatine ..... 50

5. Brechzahl der Gelatine nach der Immersionsmethode . 55

6. Brechzahl der Muskel- und Kollagenfasern ..... 57

7. Mikrophotographische Auswertung ..... 58

H. DISKUSSION ..... 68

1. Bindung der PWS bzw. PMS ..... 68

2. Kritische Erörterung der eigenen Befunde ..... 70

3. Schlußfolgerung ..... 78

I. ZUSAMMENFASSUNG ..... 82

K. LITERATURVERZEICHNIS ..... 85

# A. EINLEITUNG

## A. 1. HISTORISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDUNG DER PHOSPHORWOLFRAMSÄURE BZW. PHOSPHORMOLYBDÄNSÄURE

Es gehört zu den Aufgaben der histologischen Färbetechnik, eine Trennung der Anfärbbarkeit des Stromas von der des Parenchyms zu erreichen. Dies ist unter anderem mit den beiden Schwermetallsalzen Phosphorwolframsäure (PWS) bzw. Phosphormolybdänsäure (PMS) möglich. Aus diesem Grund wurden diese beiden Schwermetallverbindungen, insbesondere die PWS, aus der Textilfärberei in die histologische Färbetechnik übernommen. Im folgenden soll kurz dargestellt werden, warum diese beiden Säuren in der histologischen Technik so weitgehende Verwendung finden.

### A. 1.1. Die MALLORY'sche Bindegewebsfärbung und deren Modifikationen

Die PMS wurde erstmals 1891 von F. B. MALLORY (19) in die histologische Technik eingeführt. Er ließ eine wässrige Lösung von Phosphormolybdänsäurehämatoxylin 10 Minuten bis 1 Stunde auf histologische Nervengewebsschnitte einwirken. Ganglienzellen mit Fortsätzen, Achsenzylinder und Neurogliafibrillen wurden damit scharf tiefblau gefärbt.

Die erste Modifikation dieser MALLORY'schen Farblösung erfolgte 1896 durch H. RIBBERT (32), der durch kurzes Eintauchen des Präparates in 10 %ige PMS vor der Behandlung mit MALLORY's Farb-

lösung eine bessere Differenzierung aller fibrillären Bestandteile erreichte. Er schrieb dazu: "Es scheint, daß sie (gemeint ist: diese Methode) für die normale und pathologische Bindegewebssubstanz nach verschiedenen Richtungen einige Bedeutung gewinnen könnte."

Wenig später ersetzte F. B. MALLORY (20) die PMS durch die PWS. Nach der Behandlung mit wässriger PWS-Hämatoxylinlösung färbt sich das Bindegewebe tiefrosa, das Zytoplasma und die Muskulatur violett, die Achsenzylinder blaßviolett und die Markscheide blaßblau. Beide Methoden von MALLORY wurden später von anderen Forschern in vielerlei Weise modifiziert.

S. SCHUENINOFF (35) färbte 1908 zuerst mit PWS-Hämatoxylin und behandelte mit PWS nach. 3 Jahre später kehrte C. HUETER (17) die Methode von SCHUENINOFF um, indem er die histologischen Schnitte mit PWS vorbehandelte und erst dann mit PWS-Hämatoxylin färbte. Dabei bemerkte er eine chemische "Affinität" der PWS bzw. PMS zu Bindegewebe. Bei den beiden letzteren Verfahren wird das Präparat nach der Färbung lange in PWS-Lösung bzw. 50 %igem Alkohol belassen, so daß das Bindegewebe entfärbt, blaßrot oder mit bläulichem Ton dargestellt wird.

Eine der gebräuchlichsten Modifikationen der MALLORY'schen Bindegewebsfärbung stellt die Azanfärbung von M. HEIDENHAIN (14) dar, wobei die histologischen Schnitte zwischen der Azokarmin- und Anilinblaufärbung 1/2 bis 3 Stunden in 5%iger PWS-Lösung eingestellt werden. Diese Methode ist der von MALLORY an Haltbarkeit, Schärfe und Gelingen der Färbung deutlich überlegen. Sie hat sich infolge der kontrastreichen Darstellung des kollagenen Bindegewebes für die Färbung verschiedenster Drüsengewebe außerordentlich bewährt. HEIDENHAIN zog in Betracht, daß die PWS und PMS zu den "Alkaloidreagenzien" gehören und besonders in saurer Lösung eiweißfällend wirken könnten, und daß somit vielleicht die Eiweißkörper des Präparates beeinflußt

werden könnten. Ferner habe die PWS folgende doppelte Wirkung: Die PWS solle das Azokarmin aus dem Bindegewebe extrahieren und letzteres für die Anilinblaufärbung auf diese Weise vorbereiten. Diese Färbemethode stellt wiederum eine Ausgangsbasis für viele Modifikationen dar.

H. PETERSEN (27) ersetzte 1924 das Azokarmin durch Säurealizarinblau, wobei sich das Ergebnis der Färbung im Vergleich zu dem von HEIDENHAIN kaum änderte. Das durch die Behandlung mit PWS stark lichtbrechend gewordene, farblose Bindegewebe ließ er durch Zuziehen der Kondensorblende deutlicher hervortreten. Da das Bindegewebe ungefärbt war, konnte er auch die Bindegewebszellen gut erkennen.

R. v. VOLKMANN (42) färbte ossifizierende Knorpel mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN und differenzierte statt in Eisenalaunlösung in einer 5 %igen PWS-Lösung, in welcher die Knorpelgrundsubstanz und das kollagene Gewebe im Verlaufe von einer bis mehreren Stunden völlig entfärbt wurden, so daß die Zellen allein dunkel auf klarem Grund sichtbar waren.

Eine einfache und geringen Zeitaufwand erfordernde Modifikation der Azanfärbung stellt die Kernechtrot-Anilinblau-Orange-Färbung nach G. DOMAGK (8) dar. Die Azanfärbung leistet jedoch sowohl in der Darstellung der feineren Bindegewebsfasern als auch in der Differenzierung der verschiedenen Drüsenzellen mehr als diese Methode.

Bei der Hämatoxylin-Säurefuchsin-Orange-Lichtgrün-Färbung nach G. CROSSMON (6) hat die PWS bzw. PMS die Aufgabe, das kollagene Bindegewebe vollständig zu entfärben.

Am Rande sei das MALLORY-Gemisch nach J.E. CASON (5) erwähnt, eine sehr bequeme und schnelle Methode, die jedoch an Schärfe und

Haltbarkeit nicht an die Azanfärbung heranreicht. Die Farblösung enthält PWS, Orange G, Anilinblau und Säurefuchsin.

Bei der letzten bedeutenderen Modifikation der MALLORY-Färbung, genauer der Azanfärbung, verwandte W. SPECHT (40) 1963 an Stelle von Orange G in gleicher Menge den Farbstoff Tartrazin, wodurch die Färbung an Leuchtkraft, Durchsichtigkeit und Schärfe gewann.

### A. 1.2. Die MASSON'sche Trichromfärbung und deren Modifikationen

Die besonders in Frankreich sehr gebräuchliche MASSON'sche Trichromfärbung läßt das Zytoplasma durch scharfe Rotfärbung im Gegensatz zur schwarzen Kernfärbung deutlicher sichtbar werden als bei der Azanfärbung, feinste Bindegewebsfasern hingegen schlechter. Nach Beizung der Schnitte in Eisenalaunlösung wird in Regaud'schem Hämatoxylin gefärbt und in Eisenalaunlösung differenziert. In der 2. Phase wird mit Säurefuchsin gefärbt, dann mit 1 %iger PMS differenziert. Der 3. Färbegang erfolgt mit Anilinblaulösung. MASSON's (21) Ziel war, durch die PMS das Bindegewebe zu entfärben, während Zytoplasma und Erythrozyten rot gefärbt bleiben. Nach Behandlungsende erscheint das Bindegewebe intensiv blau (Anilinblau), das Zytoplasma ziegelrot, Kerne, gewisse Sekretgranula und Zentrosomen schwarz und die Gliafasern rot.

I. WALLART und Ch. HOUETTE (43) vereinfachten 1930 den Färbeprozeß von MASSON, ohne wesentliche Qualitätsabstriche hinnehmen zu müssen. Nach der Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin ließen sie die beiden weiteren Färbe- und Differenzierungsprozesse in einem Farbgemisch gleichzeitig ablaufen. Das Anilinblau wurde durch Lichtgrün ersetzt.

Schließlich empfahl J. GOLDNER (11) im Jahre 1938 eine wenig aufwendige Variation der MASSON'schen Trichromfärbung. Bei diesem modifizierten Verfahren wird in PMS-Orange so lange differenziert, bis sich das Bindegewebe vollständig entfärbt hat. Die Gegenfärbung mit Lichtgrün läßt das Bindegewebe grün erscheinen.

Die 1942 von G.N. PAPANICOLAOU (25) angegebene Originalmethode wird nach wie vor, teils mit geringen Abweichungen, von sehr vielen zytologischen Laboratorien trotz ihrer recht komplizierten Technik routinemäßig zur Diagnostik von Objekten der exfoliativen Zytologie, insbesondere von Vaginalsmears benutzt. Sie wurde in Anlehnung an die Trichromfärbung von MASSON entwickelt, indem PAPANICOLAOU als Besonderheit die Farbstoffe in alkoholische Lösung brachte. Als Farbstoffe benutzte er Hämatoxylin, Orange G mit PWS und Polychromlösung EA 36 oder EA 25. Diese Methode ermöglicht u. a. eine Bestimmung des Verhornungsgrades des Zytoplasmas, welcher durch einen Farbumschlag von blaugrün nach rot dargestellt wird.

### A. 1.3. Die PASINI'sche Färbemethode und deren Modifikationen

Die Methode von PASINI (26) aus dem Jahre 1905 liefert sehr scharfe Farbgegensätze zwischen Bindegewebe und den übrigen Gewebebestandteilen. Die Schnitte werden für 10 Minuten aus dem Wasser in eine 2 %ige Lösung von PWS übertragen. Nach kurzem Abspülen in aqua dest. wird mit einer Mischung aus Wasserblau-Orcein, Eosin-Alkohollösung, gesättigter wässriger Säurefuchsinlösung und neutralem Glycerin gefärbt. Nach der Differenzierung in absolutem Alkohol werden die Schnitte nochmals kurz in 2 %ige PWS-Lösung getaucht. Als Ergebnis zeigt sich das kollagene Bindegewebe scharf blau, das Zytoplasma hellblau, Kerne, Epithelfasern und Keratohyalin rot.

Eine Modifikation der PASINI-Methode stellt diejenige von L. WALTER

(44) dar. Die Färbung ist äußerst intensiv und elektiv für kollagene Fasern und Zytoplasma. Kollagene Fasern erscheinen blau, das Zytoplasma bis in die feinsten Ausläufer karmoisinrot. Der Unterschied gegenüber der PASINI'schen Technik besteht in der der Färbung vorausgehenden Beizung in Eisenalaunlösung.

## A. 2. ERGEBNISSE ALLGEMEINER HISTORISCHER UNTERSUCHUNGEN AN PWS BZW. PMS

Die sehr weit verbreitete Anwendung der PWS bzw. PMS in der mikroskopischen Technik hat eine Reihe von Forschern dazu veranlaßt, die Bedeutung der beiden Substanzen für die histologische Färbung vom theoretischen Standpunkt aus zu erörtern.

So schrieb RAWITZ (31) 1908 folgendes: "Es ist sonderbar, daß eines der mächtigsten Fällungsmittel der Eiweißstoffe, die Phosphorwolframsäure, bisher in der mikroskopischen Technik noch keine Verwendung zur Fixierung tierischer Organe und Gewebe gefunden hat. Als ich das MALLORY'sche Wolframhämatoxylin prüfte, fielen mir bei mannigfachen Modifikationen der MALLORY'schen Vorschrift Eigentümlichkeiten in den Präparaten auf, die nur durch die PWS hervorgebracht sein konnten und die mir schon damals ein Studium der Wirkung der Säure auf tierische Gewebe als aussichtsreich erscheinen ließen."

W. v. MÖLLENDORF (22) stellte 1924 fest, daß die Wirkung der PWS bzw. PMS keine reine Säurewirkung sein könne. Bei mit Eosin gefärbten Präparaten und nachfolgender Behandlung mit 2 %iger PMS, 2 %iger Salzsäure bzw. 2 %iger Essigsäure sei nur das PMS-behandelte Präparat differenziert: Das Bindegewebe sei absolut farblos, Muskelfasern, Erythrozyten, Epithelzellenzytoplasma und Zellkerne leuchtend rot gefärbt. Dadurch, daß die PWS bzw. PMS nur langsam im Gewebe vor-

dringen, gelinge es, die Säurewirkung auf das weitporigere kollagene Gewebe zu beschränken. Läßt man die PWS bzw. PMS länger einwirken, so erkenne man an der stärkeren Lichtbrechung aller Strukturen, daß PWS bzw. PMS zurückgeblieben seien.

M. SEKI (37) konnte diese Theorie bestätigen: Die PWS bzw. PMS assoziieren sich vornehmlich an dem basenreichen kollagenen Bindegewebe und wirken auf einen sich dort befindlichen elektronegativ geladenen Säurefarbstoff so stark verdrängend, daß dieser daraus bald gänzlich vertrieben werde. Die PWS bzw. PMS lagerten sich also im Austausch mit dem Farbstoff ins Gewebe ein und reicherten sich vornehmlich an den kollagenen Fasern an, viel weniger an der glatten Muskulatur und dem Darmepithel und fast gar nicht an den Erythrozyten.

In den folgenden Jahren beschrieben noch viele Wissenschaftler eigenartige Änderungen der Lichtbrechung histologischer Strukturen, welche mit PWS bzw. PMS in Berührung gekommen waren. So beobachtete z.B. WURMBACH (46) bei der Darstellung der Knorpelstrukturen mit RIBBERT's PMS-Hämatoxylin eine sehr bemerkenswerte Steigerung der Doppelbrechung des Kollagens. Dadurch hatte er die Möglichkeit, bei dünnen Schnitten von Knorpelgewebe Strukturbilder mit dem exakten Verlauf der Fibrillen zu erhalten.

Während die meisten anderen Autoren einschlägiger Publikationen im Bereich der histologischen Technik tätig waren und die Wirkung der PWS bzw. PMS nur qualitativ untersucht hatten, stellten K. KÜHN und Mitarb. (18) 1958 quantitativ die PWS-Einlagerung in das Kollagen fest, indem sie die aufgenommene Menge PWS pro Gramm Kollagen bestimmten. Sie zeigten an Kollagen mit systematisch veränderten Seitenketten, daß ein fester gebundener Anteil der PWS (480 mg PWS/g Kollagen)

durch Argininreste und ein lockerer gebundener, auswaschbarer Anteil (400 mg PWS/g Kollagen) durch Lysin- und Oxylysinreste des Kollagens gebunden werden. Ferner gelang es ihnen, im Elektronenmikroskop die charakteristische Querstreifung der Kollagenfibrillen mit einer Periode von 640 Å nach Behandlung der Kollagenfibrillen mit PWS in 13 bis 14 dunkle Querstreifen zu unterteilen.

## B. VORAUSSETZUNGEN

Man unterscheidet bei den mikroskopischen Objekten zwischen Absorptionsobjekten (Amplitudenobjekten) und Verzögerungsobjekten (Phasenobjekten).

Bei den Amplitudenobjekten wird ein Teil der beleuchtenden Strahlung von den Objektstrukturen absorbiert, so daß bei der Bildentstehung unterschiedliche Amplituden (Intensitäten) des durchfallenden Lichtes resultieren. Für die mikroskopische Betrachtung solcher Objekte im durchfallenden Licht eignet sich besonders die Hellfeldmethode. Die Brechzahlen der Objektstrukturen, des Einbettungsmittels, des Objektträgerglases und des Deckglases sollten dabei annähernd gleich sein, um die für dieses Abbildungsverfahren nachteiligen Brechungen an den Grenzen von Strukturelementen unterschiedlicher Brechzahl und damit einen negativen Einfluss auf die Bildqualität möglichst weitgehend auszuschalten.

Phasenobjekte hingegen verändern die Intensitätsverhältnisse des durchfallenden Lichtes kaum. Sie verursachen infolge der Brechzahldifferenz von Objektstruktur gegenüber umgebendem Medium nur eine kleine Phasenverschiebung der durchfallenden Lichtwellen, welche vom Auge im durchfallenden Hellfeld nicht wahrgenommen werden kann. Für die Untersuchung solcher Präparate müssen deshalb Verfahren angewandt werden, die Phasenverschiebungen in von unserem Auge wahrnehmbare Helligkeitsunterschiede umsetzen. Die bekannteste dieser mikroskopischen Methoden ist das Phasenkontrastverfahren, bei dem durch eine künstlich herbeigeführte Phasenverschiebung des nicht abgebeugten Lichtes (durch eine Phasenplatte in der Objektebene)

kleine Gangunterschiede (Brechzahldifferenz von Objektstruktur und umgebendem Einschlußmittel x Dicke der Objektstruktur) in im phasenkontrastmikroskopischen Bild sichtbare Intensitätsunterschiede umgewandelt werden. Um einwandfreie Bilder zu erhalten, sollte beim Phasenkontrastverfahren der Gangunterschied gegenüber der Wellenlänge des benutzten Lichtes klein sein. Native, also unbehandelte biologische Objekte besitzen häufig bereits diese wünschenswerten Eigenschaften eines Phasenpräparates.

Da histologische Präparate aber gewöhnlich fixiert und gefärbt werden, handelt es sich bei diesen überwiegend um Mischobjekte. So resultiert die "optische Gesamtstruktur" des fixierten und gefärbten Präparates aus der "primären optischen Struktur" (der durch die physikalischen Eigenschaften der Objektelemente unmittelbar bedingten Lichtbeeinflussung) und der "sekundären optischen Struktur", die durch fremde oder veränderte Substanzen (z. B. Farbstoff- bzw. Metallpartikel), durch die präparative Methodik in das Objekt eingeführt, mittelbar objektbedingte Lichtbeeinflussung hervorruft. Die mikroskopisch-optisch wahrnehmbare Struktur setzt sich also aus der Summe von Refraktions- und Absorptionsinhomogenitäten zusammen (HASELMANN 12).

Aus diesem Grund wird besonders die Betrachtung von fixierten und gefärbten Präparaten im Phasenkontrast problematisch. Das Prinzip der Phasenkontrastabbildung setzt das Vorhandensein von geringen Unterschieden der optischen Dichte zwischen Objektstruktur und umgebendem Medium voraus. Th. v. HIRSCH (15) empfahl für die Betrachtung eines Präparates im Phasenkontrast ein Einschlußmittel, das mit seinem Brechungsindex um 0,02 bis 0,03 unter- oder überhalb des Wertes für die wasserfreie Gewebssubstanz liegt. Nur wenn der Betrag der Brechzahldifferenz zwischen Einbettungsmedium und Objektstruktur nicht größer als 0,03 sei, werde man bei Phasenkontrastbetrachtung scharfe und kontrastreiche Bilder erhalten. Bei Brech-

zahldifferenzen über 0,03 werde der Winkel des "Streulichtes" so groß, daß nur noch mit Objektiven hoher Apertur scharfe Bilder entstehen könnten. Gleichzeitig zeigte er auf, daß es anorganische Säuren (PWS, PMS, Kieselwolframsäure, angesäuerte Lösungen von Natriumwolframat oder -molybdat, weiterhin Zinnchloridchlorwasserstoffsäure, Kaliumbichromat und andere Schwermetallsäuren) gibt, die einen vom Gewebe wesentlich verschiedenen Brechungsindex besitzen und die von verschiedenen Gewebebestandteilen unterschiedlich stark adsorbiert werden. Mit Hilfe der aufgeführten Substanzen sei es möglich, "eine Differenzierung des Bildes lediglich durch die Wahl des Einschlußmediums zu erhalten."

Weitere Autoren (HASELMANN 13, MÜLLER 23) beschrieben, daß das Verhältnis der Brechzahlen von Einbettungsmedium und Objektstruktur bei phasenkontrastmikroskopischer Untersuchung den Bildkontrast entscheidend beeinflußt.

## C. FRAGESTELLUNG

Aus dem oben unter "Voraussetzungen" Beschriebenen resultiert folgendes: Ein Grundprinzip bei der Anfertigung gefärbter histologischer Präparate ist die Einbettung der eigentlichen Gewebestruktur in ein Einschlußmedium, das in seiner Brechzahl möglichst nahe bei der des Glases von Objektträger und Deckglas einerseits und der der eigentlichen Objektstrukturen liegen soll. Damit soll erreicht werden, daß die optischen Weglängenunterschiede, die durch Brechzahldifferenzen einzelner Objektstrukturen untereinander oder gegenüber dem umgebenden Medium bedingt sind, weitgehend ausgeschlossen werden und damit die Eigenschaften des Objekts im Sinne von Phasenstrukturen weitestgehend ausgeschaltet werden. Es soll damit also letztlich bewirkt werden, daß das gefärbte, eingeschlossene histologische Objekt im Idealfall ein reines Absorptions- respektive Amplitudenobjekt wird und kein Phasenobjekt mehr darstellt, wie das beim nativen biologischen Objekt der Fall ist.

Daß dieser Idealfall des reinen Absorptionsobjektes in der Praxis immer nur mit einiger Annäherung erreicht wird, zeigt sich bereits bei normalen Beobachtungen. So tritt z. B. bei Querschnitten durch Blutgefässe besonders bei Arterien immer deutlich der Effekt auf, daß beim Heben des Tubus die Elastica interna der Gefässe deutlich heller erscheint, beim Senken des Tubus dunkler wird. Es handelt sich bei diesem Phänomen um eine Analogie zu der Erscheinung, die in der Mineralogie als Becke'sche Linie bezeichnet wird, welche an den Grenzflächen zweier Medien verschiedener Lichtbrechung als heller Lichtsaum beobachtet werden kann und (je nach Dimension) auf Brechung, Reflexion und Beugung beruht (RINNE und Mitarb. 33).

Entsprechende Beobachtungen zeigten, daß es in der histologischen Technik viele Behandlungsmethoden gibt, die die Brechzahl bestimmter Gewebsstrukturen verändern und somit das mikroskopische Bild beeinflussen. Insbesonders wurden Behandlungsmethoden, bei denen PWS bzw. PMS verwandt wurde, für eine Brechzahlerhöhung einiger Gewebssubstanzen verantwortlich gemacht. Zusammenfassend wurden folgende Phänomene mit einer PWS- bzw. PMS-Behandlung in Verbindung gebracht:

1. Manche Objektstrukturen, vor allem elastisches und kollagenes Bindegewebe, zeigen bei leichter Defokussierung des Objektives im Hellfeld einen deutlichen hellen Lichtsaum, die sogenannte Becke-Linie. Dieser Effekt stört je nach der Richtung und des Ausmaßes seiner Ausbreitung mehr oder weniger. Bei dicht aneinanderstehenden Objektstrukturen greift die "Becke-Linie" in das Objektbild über und kann letztlich feinere Struktureinzelheiten überdecken. Es können sogar rein optische Pseudostrukturen entstehen (OETTLÉ 24). Die gefärbten Kollagenfasern treten leuchtender hervor als bei anderen Färbetechniken ohne PWS- bzw. PMS-Behandlung, wobei das Ausmaß dieses "Aufleuchtens" von dem Grad der Abblendung der Beleuchtung abhängt.

2. Gelegentlich wird beobachtet, daß in Farbmikrophotographien bei sehr schwachen Vergrößerungen bei Präparaten, die mit PWS bzw. PMS behandelt worden sind (z. B. Azan-gefärbte Präparate), im Bereich der Kollagenstrukturen Farbverschiebungen auftreten, die auch auf die Brechzahlerhöhung durch PWS bzw. PMS zurückgeführt werden könnten (nach einer mündlichen Mitteilung von Prof. Dr. H. HASELMANN, Tübingen).

3. Bei der durch PWS bzw. PMS bedingten Steigerung der Brechzahl und damit des Gangunterschiedes sonst gleicher Strukturen wird bei der Anwendung des Phasenkontrastverfahrens ein Übergang

von positivem zu negativem Bildkontrast deutlich (HASELMANN 13).

4. Eigentümliche Erscheinungen, die durch Brechzahlverschiebungen bedingt sind, treten bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung der mit PWS bzw. PMS behandelten Präparate häufiger und ausgeprägter auf als bei Hellfelduntersuchungen. So ändert sich der Bildkontrast im phasenkontrastmikroskopischen Bild in Abhängigkeit vom Gangunterschied der Präparatstrukturen gegenüber dem Einbettungsmedium. Wird der Gangunterschied durch eine Behandlung der Präparate mit PWS bzw. PMS erhöht, so resultiert bei feinen Strukturen eine Kontrasterhöhung, bei dickeren Strukturen eine Kontrasterniedrigung oder sogar das Umschlagen des Phasenkontrastbildes von positivem zu negativem Kontrast.

Vor dem Hintergrund dieser oben beschriebenen Beobachtungen soll in der vorliegenden Arbeit versucht werden, folgende Fragen zu klären:

a. Können die unter 1. - 4. erwähnten Phänomene durch eine Brechzahlerhöhung bestimmter Objektstrukturen infolge PWS- bzw. PMS-Behandlung bedingt sein?

b. Ist bei Absorptionsobjekten nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS die Forderung, daß die Brechzahlen der Präparatstrukturen, des Einbettungsmittels, des Objektträgerglases und des Deckglases annähernd gleich sein sollen, noch erfüllt?

c. Ist ein Phasenobjekt auch nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS noch oder sogar besser geeignet, phasenkontrastmikroskopisch untersucht zu werden?

d. Die Veränderung der Brechzahl infolge PWS- bzw. PMS-Behandlung soll quantifiziert werden und der Einfluß einiger in der histologischen Technik möglichen Variablen im Hinblick auf die Brechzahl verschiedener Objektstrukturen überprüft werden.

## D. ALLGEMEINES

1. Auf die Verwendung der PWS bzw. PMS als "Farbstoff" in der Elektronenmikroskopie soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

2. PWS und PMS werden parallel beschrieben.

3. Da die PWS in der mikroskopischen Technik erheblich häufiger Verwendung findet als die PMS, soll die PWS hier bevorzugt abgehandelt werden.

# E. MATERIAL UND METHODEN

## E. 1. MESSOBJEKTE

Im folgenden werden verschiedene Objekte beschrieben, die alle hinsichtlich der Brechzahlveränderung durch die PWS bzw. PMS untersucht worden sind.

Die hierbei verwendete Phosphorwolframsäure (PWS) stammte von der Firma MERCK und war, der heute gültigen chemischen Nomenklatur entsprechend, als Wolframatophosphorsäure, krist. (p.a.), Art. 582 bezeichnet. Das Molekulargewicht in wasserfreiem Zustand sollte 2880,17 betragen.

Die Phosphormolybdänsäure (PMS) der Firma MERCK (Molybdatophosphorsäure (p.a.), Art. 532) hatte ebenfalls ein hohes Molekulargewicht, nämlich 1825,25 (wasserfrei).

### E. 1.1. Nabelschnur

Als erstes Phasenobjekt wurde ein Querschnitt durch eine menschliche Nabelschnur gewählt, ein Bouin-fixierter, ungefärbter Paraffinschnitt. In diesem faserarmen, grundsubstanzenreichen Bindegewebspräparat sollte die Änderung des Gangunterschiedes durch die Behandlung mit PWS festgestellt werden. Die Messungen wurden bei diesem Präparat im Bereich des gallertigen Bindegewebes durchgeführt.

### E. 1.2. Erythrozyten

Im Gegensatz zu den vorwiegend bindegeweblichen Nabelschnurpräparaten handelte es sich bei den Erythrozyten um rein zytoplasmatische

Phasenobjekte. Diese Präparate wurden in der üblichen Weise durch Ausstreichen frischen Blutes hergestellt.

### E. 1.3. Eiklar

Das Eiklar aus frischen Hühnereiern sollte als einfaches Modell für mikroskopisch unstrukturiertes Eiweiß dienen. Bei den Versuchen stellte sich jedoch heraus, daß das Eiklar aufgrund seiner physikalischen Labilität für die Verwendung als Modell mit diesen Eigenschaften unbrauchbar war.

### E. 1.4. Verschiedene Gelatinearten

Wie bereits beschrieben worden ist, scheint die PWS bzw. PMS bevorzugt die Brechzahl der kollagenen Bindegewebsfasern zu beeinflussen. Da aber große Serien von Brechzahlmessungen an den feinen Kollagenfasern sehr umständlich und zeitraubend sind, wurde dafür ein einfaches Modell gesucht, dessen Brechzahl sich schnell bestimmen läßt und bei dem die erhaltenen Ergebnisse sich auf Kollagenfasern übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurden unter Berücksichtigung der chemischen Verwandtschaft (s. Tab. 1) von Gelatine und Kollagen verschiedene Versuche mit Gelatine durchgeführt.

Tabelle 1: Vergleich zwischen Kollagen und Gelatine (WUNDERLICH 45)

| Zusammensetzung von Kollagen | | Gelatine (saurer Aufschluß) |
|---|---|---|
| Glykokoll | 27,2 % | 26,4 % |
| Alanin | 9,5 % | 10,7 % |
| Glutaminsäure | 11,3 % | 11,3 % |
| Prolin | 15,1 % | 16,2 % |
| Oxyprolin | 14,0 % | 13,5 % |
| Molekulargewicht | 360000 | 20000-200000 |

Nach dem angenommenen Strukturmodell für Kollagen sind 3 einzelne Peptidketten in sich schraubenartig verschlungen, die sich wiederum zu einer weitgestreckten Spirale (alpha-Helix) verformt haben. Bei der Gelatinegewinnung sollen durch chemische und thermische Behandlung diese Kollagenmoleküle sowohl von der Seite als auch der Länge nach in einzelne "Litzen" und Gruppen von Fäden aufgeschlossen und "zerrissen" werden (WUNDERLICH 45).

Röntgendiagramme von Kollagen und Gelatinegallerten lassen die Annahme zu, daß die Eigenschaften einer Gallerte aus einer Gelatinelösung auf das Bestreben zurückzuführen ist, den Ordnungszustand der ursprünglichen Kollagenstruktur wieder anzunehmen (persönliche Mitteilung von Priv. Doz. Dr. H. HÖRMANN, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, HOPP 16).

a. Photoplatten (Dia-Repro normal)

Nachdem die Brauchbarkeit der Gelatine als "Kollagenmuster" feststand, wurde zunächst versucht, die dünne Gelatineschicht von Photoplatten (Diapositiv-Platten der PERUTZ-Photowerke) zur Brechzahlbestimmung heranzuziehen.

Die Gelatine hat nach Angaben des Herstellers (AGFA-GEVAERT N.V., Septestraat 27, B-2510 Mortsel) folgende Eigenschaften:

28-30 Gramm Gelatine pro $m^2$ Photoplatte
Isoelektrischer Punkt: 4,8
Viskosität: 15,4 Centipoise
Gelfestigkeit: 172 Bloom

b. Gelatineschicht ("Emulsionsschicht") eines Kleinbild-Positivfilms

c. Blattgelatine (Dr. OETKER)

Eine solche Blattgelatine (Dr. A. OETKER, Bielefeld) enthält meist ein Gemisch aller Gelatinearten vom Molekulargewicht

20000 bis 200000 (persönliche Mitteilung von Dipl.-Chem. A. MÜLLER, Deutsche Gelatinefabriken STOESS & Co. GmbH, Göppingen).

d. Gelatine (STOESS)

Die Ergebnisse der oben aufgeführten Gelatinearten konnten wegen Inhomogenität der Substanz, zu geringer Ähnlichkeit mit Kollagen und zu dünner Schicht der Gelatine nicht befriedigen. Deshalb wurde nach einer Gelatine gesucht, die dem Kollagen im Aufbau sehr nahe kommt und weitgehend homogen ist. Diese Bedingungen (s. Tab. 2) wurden von der Gelatine (Chargen-Nr. 48678) der Deutschen Gelatinefabriken STOESS & Co. GmbH in Göppingen erfüllt (Daten nach persönlicher Mitteilung von Dipl.-Chem. A. MÜLLER):

Es handelt sich hierbei um eine hochviskose Schweineschwartengelatine des 1. Abzuges, wobei die meisten chemischen Bindungen erhalten bleiben. Alle Schweine waren gleichrassig und zum Zeitpunkt der Schlachtung zwischen 8 und 9 Monate alt.

Tabelle 2: Eigenschaften der STOESS-Gelatine

Charge-Nr.: 48678
Herstellungsdatum: 28. 1. 1974
Herstellungsart: Aufschluß nach saurem Verfahren
Gelfestigkeit: 278 Bloom
Viskosität: 169 Millipoise
PH-Wert: 5,2
Erstarrungspunkt: $27^{\circ}$ C
Leitfähigkeit: 630 Mikrosiemens pro cm
Restfeuchte: 9,8 %
Natriumsulfatgehalt: ca. 5 %

Die Werte der Tabelle 2 gelten nur unter den in der Technik üblichen Meßbedingungen.

### E. 1.5. Muskel- und Kollagenfasern

Um die Gültigkeit der Ergebnisse, die mit der STOESS-Gelatine gewonnen worden sind, auf kollagenes Bindegewebe histologischer Präparate übertragen zu können, wurden formolfixierte, ungefärbte Längsschnitte quergestreifter Muskeln, welche für die Brechzahlmessungen ausreichend kollagenes Bindegewebe enthielten, zur Untersuchung herangezogen. Es handelte sich um Material von einer Muskelbiopsie bei einem 6-jährigen Jungen. Die Paraffinschnitte waren zwischen 7 und 10 µm dick. Bei diesem Präparat konnte zusätzlich ein dem kollagenen Bindegewebe ähnliches Verhalten der quergestreiften Muskelfasern hinsichtlich der Brechzahländerung durch die Behandlung mit PWS bzw. PMS abgeklärt werden.

## E. 2. METHODEN ZUR BRECHZAHLBESTIMMUNG

### E. 2.1. ABBE-Refraktometer

Das ABBE-Refraktometer von C. ZEISS (47) dient zur Bestimmung der Lichtbrechungszahl und der Farbenzerstreuung von Flüssigkeiten, plastischen und festen Körpern. Man mißt, je nach Art des Objektes, im durchfallenden oder reflektierten Licht. Da die ermittelten Werte der Brechungszahlen, der Eichung des Geräts entsprechend, exakt nur für das Licht der gelben Natriumspektrallinie (D-Linie, Wellenlänge 589,3 nm) gelten, werden hier alle mit Hilfe dieses Refraktometers gemessenen Brechzahlen für $\lambda$ = 589,3 nm angegeben.

### E. 2.2. Mikrorefraktometer nach JELLEY

Das Mikrorefraktometer nach JELLEY von E. LEITZ ist einfacher als das ABBE-Refraktometer aufgebaut und bietet weniger Verwendungsmöglichkeiten. Die Konstruktion des Gerätes erlaubt nur Brechzahlmessungen an Flüssigkeiten, welche in einen kleinen prismatischen

Hohlraum eingebracht werden. Durch Verdunsten des Lösungsmittels können hier leicht Fehler bei der Messung der Brechzahl unterlaufen.

### E. 2.3. Immersionsmethode

Ein transparenter, farbloser und isotroper Körper tritt bei der mikroskopischen Untersuchung im Hellfeld nur dann in seinen Umrissen in Erscheinung, wenn er eine von seinem umgebenden Medium abweichende Brechzahl aufweist. Dabei wird er um so deutlicher sichtbar, je größer der Unterschied der Lichtbrechung des Körpers gegenüber der des ihn umgebenden Mediums ist. Bettet man also den zu untersuchenden Körper nacheinander in Medien bekannter, verschiedener Brechzahlen ein, so stellt man fest, daß bei einer bestimmten Brechzahl des Einbettungsmittels die Konturen des Körpers verschwinden, und zwar dann, wenn die Brechzahlen von Einbettungsmedium und Objekt ungefähr gleich sind (BURRI 4, SPANGENBERG 39).

Als "Indikator" für die Brechzahlangleichung von Objekt und Einschlußmedium dient die Becke'sche Linie. Beim Heben des Tubus wandert diese helle Lichtlinie in das höherbrechende Medium. Diese Methode läßt Brechzahlunterschiede bis zu 0,001 erkennen (BEYER 3).

Weitere Hilfsmittel, allerdings nur zur gröberen Bestimmung der Brechzahl einer Objektstruktur sind das "Chagrin", Rauhigkeitserscheinungen auf dem Objektbild, und das "Relief", das plastische Hervortreten von Objektstrukturen. Beide Phänomene treten bei größeren Brechzahlunterschieden zwischen Objekt und Einbettungsmittel auf (RINNE und BEREK 33). Auf diese Verfahren soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie zu genauen Messungen der Brechzahl, wie sie in dieser Arbeit gefordert wurden, nicht geeignet erschienen.

Zur Feineinstellung der Brechzahl des Einbettungsmittelgemisches auf diejenige der Objektstruktur dient im Phasenkontrast das Phänomen des "Halos" (entspricht der Becke'schen Linie im Hellfeld) und schließlich das Einstellen der zu messenden Objektstruktur auf Phasenkontrast Null. Man kann so Brechzahlunterschiede bis 0,0001 erkennen (BARER 1), also um eine Größenordnung genauer als mit Hilfe der Becke'schen Linie.

Die Brechzahl der Einbettungsmittel kann einfach und mit ausreichender Genauigkeit mit dem ABBE-Refraktometer gemessen werden. Dabei ist die starke Änderung der Brechzahlen von Flüssigkeiten bei Temperaturschwankungen (ungefähr 0,0005 pro Grad Celsius) unbedingt zu beachten.

Alle Meßwerte nach der Immersionsmethode und nach den im folgenden beschriebenen interferometrischen Methoden werden bei einer Wellenlänge von 546,07 nm (entsprechend der grünen Quecksilberlinie) angegeben, da eine solche Arbeitsbedingung für die benutzten Geräte vorgesehen ist und die Angabe in dieser Form überdies der DIN-Norm (7) entspricht.

## E. 2.4. Interferometrische Methoden

a. Messung mit Interferenzstreifenverschiebung

Die mit einem Interferenzmikroskop erzeugten Interferenzstreifen werden mittels einer Justiervorrichtung so verschoben, daß der dunkle Interferenzstreifen nullter Ordnung die zu messende Objektstruktur kreuzt. An der Streifenverschiebung gegenüber dem Umfeld nach Eintritt des Streifens in die Objektstruktur kann mit Hilfe des Fadenkreuzes eines Okularschraubenmikrometers die durch das Präparat verursachte Streifenverschiebung gemessen werden. Die Interferenzstreifen sind jeweils um den Betrag einer Wellen-

länge des benutzten Lichtes (546 nm) voneinander entfernt. Die Phasendifferenz von Objekt gegenüber dem Umfeld kann so durch eine einfache Rechnung ermittelt werden.

b. Messung mit einer Halbschatteneinrichtung und SÉNARMONT-Kompensation

Der SÉNARMONT-Kompensator, der in dem Interferenzmikroskop vor dem Analysator in den Strahlengang eingeführt ist, wandelt das vom Objekt her kommende elliptisch polarisierte Licht in lineare Lichtschwingung um. Die Schwingungsrichtung hängt von der Phasendifferenz zwischen Objekt und Umfeld ab, welche durch Drehen des Analysators bestimmt wird. Die Halbschatteneinrichtung, welche sich in der Zwischenbildebene des Mikroskops befindet, gewährleistet eine genaue Ausrichtung des Analysators in die Kompensationsstellung. In beliebiger Stellung des Analysators sind beide Halbschattenflächen verschieden hell. Zur Messung des Gangunterschiedes wird der Analysator so lange verdreht, bis im Umfeld gleiche Helligkeit der Halbschattenflächen eingestellt ist, danach wird dasselbe Verfahren in der zu messenden Objektstruktur angewandt. Aus dem dabei in Grad gemessenen Drehwinkel kann leicht die Phasenverschiebung von Objekt gegenüber dem Umfeld berechnet werden. 180 Grad entsprechen dabei einer Wellenlänge des verwendeten Lichtes (546 nm).

Die Genauigkeit dieser Messung liegt bei ca. 1/200 Wellenlänge, womit sie die unter a. beschriebene Methode diesbezüglich übertrifft (STOCK 41, ZEISS 49, 50). Der Nachteil der Messungen mit einer Halbsc hatteneinrichtung mit SÉNARMONT-Kompensator liegt darin, daß die Ablesung der Analysatorstellung nach jeweils 180 Grad Drehung (entsprechend einer Wellenlänge Phasenverschiebung) gleiche Ergebnisse vortäuscht, d. h., daß z. B. ein Objekt

mit einer Phasenverschiebung von 2,37 Wellenlängen auf diese Weise meßtechnisch nicht von einem mit 0,37 Wellenlänge zu unterscheiden ist. Zur deshalb erforderlichen Orientierung über die Größenordnung der Phasendifferenz dient die Messung mit Interferenzstreifenverschiebung.

## E. 3. VERSUCHSANORDNUNGEN

### E. 3.1. Physikalische Eigenschaften von PWS bzw. PMS

a. Messung der Brechzahl an unterschiedlich konzentrierter PWS bzw. PMS

Da sich die PWS bzw. PMS in größeren Mengen in das Kollagen einlagert, war es zunächst notwendig, die eigenen Brechzahlen von unterschiedlichen Konzentrationen wässriger Lösungen dieser beiden Säuren bis zum Sättigungspunkt hin festzustellen. Dies wurde zum einen mit dem ABBE-Refraktometer von C. ZEISS, zum anderen mit dem Mikrorefraktometer nach JELLEY von E. LEITZ mit dem N-Prisma durchgeführt. Von je 10 Messungen einer Säurekonzentration wurde das arithmetische Mittel gebildet und in ein Diagramm eingetragen. Als Lichtquelle bei den Messungen diente eine Natriumspektrallampe (Wellenlänge 589,3 nm), die Meßtemperatur betrug 21° C.

b. Dispersion der PWS bzw. PMS

Um die Dispersion, d. h. die Abhängigkeit der Brechzahl von der Wellenlänge des Lichtes zu bestimmen, wurden Messungen am ABBE-Refraktometer von C. ZEISS mit dem Prisma 7 in An-

lehnung an DIN 58884 durchgeführt. Die erforderlichen Korrekturdaten für die verschiedenen Wellenlängen wurden aus der Gebrauchsanleitung des ABBE-Refraktometers (ZEISS 47) entnommen. Die Brechzahl wurde an 50 Gew.-%iger PWS bzw. PMS mit Hilfe von Interferenzfiltern bei einer Wellenlänge von 477, 536, 589, 649 und 682 nm bei 21° C je 5 Mal gemessen.

c. Absorptionsspektren der PWS bzw. PMS

Hierbei sollte überprüft werden, ob die unter "Fragestellung" beschriebenen Phänomene bei der Untersuchung der mit PWS bzw. PMS behandelten Präparate im Phasenkontrast womöglich mit den Licht-Absorptionseigenschaften der PWS bzw. PMS erklärt werden könnten. Die Messung der Lichtabsorption von5 und 50 Gew.-%iger PWS bzw. PMS gegenüber aqua dest. erfolgte mit dem Spektralphotometer PMQ II von C. ZEISS in einer Flüssigkeitsküvette mit 20 mm Schichtdicke.

## E. 3.2. Messung der optischen Dichte

In dieser Versuchsserie sollte die Veränderung des Gangunterschiedes an Strukturen eines typischen Phasenpräparates (Nabelschnur, Mensch, quer) gegenüber dem Einbettungsmittel vor und nach der Behandlung mit PWS festgestellt werden. Hierzu wurde das Produkt aus Dicke und Brechzahl der Strukturelemente gemessen.

Zunächst wurde das Paraffin aus dem ungefärbten histologischen Präparat mit Xylol herausgelöst. Danach folgte die absteigende Alkoholreihe (alk. abs., 96, 90, 80, 70, 40 %) bis zum aqua dest., das mehrmals gewechselt wurde. Da die Brechzahl des Bindegewebes vor und nach der Behandlung mit PWS gegen das Einbettungsmittel gemessen werden sollte, wurde die Brechzahl des Einbettungsmittels sehr

konstant gehalten. Dies wurde erreicht, indem das wässrige Präparat zunächst vorsichtig mit Filtrierpapier abgetrocknet wurde und sofort im Überschuß mit dem nicht erhärtenden Einschlußmittel W 15 der Firma C. ZEISS eingedeckt wurde. Das überschüssige W 15, das infolge leichter Schrägstellung des Objektträgers abfloß, wurde so lange durch tropfenweises Zugeben von neuem W 15 ersetzt, bis das abgeflossene Einbettungsmedium eine konstante Brechzahl aufwies, d. h., kein Wasser des Präparates mehr darin gelöst war. Die Messung der Brechzahl erfolgte mit dem ABBE-Refraktometer. Das letztlich aufgelegte Deckglas wurde mit einem 20 g Gewichtsstück beschwert, bis kein Einbettungsmittel mehr darunter hervorquoll.

Die Messung des Gangunterschiedes wurde mit Hilfe der beiden oben beschriebenen (E. 2.4.) interferometrischen Methoden durchgeführt:

a. Messung mit Interferenzstreifenverschiebung

Gerät: ZEISS-Standard Universal POL-Mikroskop mit der interferenzmikroskopischen Ausrüstung nach JAMIN-LEBEDEFF
Objektiv: Achromat POL Int II 40/0,65
Optovar: Stellung 2X
ZEISS-Analysatorokular
Interferenz-Kondensor: POL Int II
Wellenlänge: 546 nm

Gemessen wurden größere, homogene, gallertige Bindegewebsstrukturen. Die Interferenzstreifenmethode diente dabei nur zur Abschätzung der Größenordnung der Phasenverschiebung.

b. Halbschattenmethode mit SÉNARMONT-Kompensator

An derselben Objektstelle, die bereits mit der Streifenmethode grob vermessen worden war, wurde nun die Phasenverschiebung mit der

Halbschattenmethode untersucht. Die Differenz der optischen Dichte des Einbettungsmittels und der zu messenden Objektstruktur ergab den Gangunterschied. Abschließend wurde eine genaue Zeichnung der Meßstelle mit der Halbschattengrenze angefertigt, um den Meßvorgang nach der Behandlung mit PWS unter denselben Bedingungen, also an den gleichen Strukturelementen, ablaufen lassen zu können. Folgende Instrumente fanden bei der Messung Verwendung:

Gerät: ZEISS-Standard Universal POL-Mikroskop mit der interferenzmikroskopischen Ausrüstung nach JAMIN-LEBEDEFF
Objektiv: Achromat POL Int II 40/0,65
Optovar: Stellung 2X
Aufsatzrohr mit Analysatorokular von E. LEITZ mit Halbschattenkeil mit stetig steigendem Halbschattenwinkel
Interferenz-Kondensor: POL Int II
SÉNARMONT-Kompensator, 1/4 Wellenlänge, 546 nm
Wellenlänge: 546 nm

Vor der Behandlung der Nabelschnurschnitte mit PWS wurde das Deckglas entfernt und das W 15 mit aqua dest. vollständig weggespült. Als nächste Behandlungsschritte folgten 10 min in 10 Gew.-%iger PWS, dann 2 x 5 min in aqua dest., abschließend einbetten genau wie vor der 1. Messung. Die 2. Messung des Gangunterschiedes entsprach in allen Einzelheiten der oben beschriebenen Messung der Phasendifferenz des Präparates ohne PWS-Behandlung. Das Endergebnis stellt die Differenz der Gangunterschiede (zwischen Objekt und Einbettungsmittel) vor und nach der Behandlung mit PWS dar. Insgesamt wurden an 7 Präparaten je 5 Messungen durchgeführt, von deren Ergebnis das arithmetische Mittel in einem Schaubild aufgetragen wurde.

Beim zweiten Phasenpräparat (Erythrozyten, Mensch) dieser Versuchsserie sollte ebenfalls die Änderung der optischen Dichte durch eine Behandlung mit PWS gemessen werden. Die Blutausstriche wurden folgendermaßen fixiert:

1. Serie: 10 - 30 min in Methanol
2. Serie: 10 - 30 min in 10 %iger Formollösung
3. Serie: bis zu 24 h in einer Petrischale über den Dämpfen aus unverdünntem Formol mit dem Ausstrich nach unten

Alle Präparate wurden nach der Fixierung mehrmals in aqua dest. ausgewaschen. Da das Einbettungsmittel W 15 von C. ZEISS die Erythrozyten wegen des zu geringen Gangunterschieds zu kontrastarm erscheinen ließ, wurde aqua dest. statt W 15 gewählt. Nach der 5 min dauernden Behandlung mit 5 bzw. 10 Gew.-%iger PWS wurden die Erythrozyten 2 x 5 min in aqua dest. ausgewaschen. Der restliche Versuchsablauf und die Messungen der Phasendifferenz vor und nach der Behandlung der Erythrozyten mit PWS erfolgten wie oben bei den Nabelschnurpräparaten beschrieben.

### E. 3.3. Vorversuche zur Messung der Brechzahl

Da in den bisherigen Versuchen nur das Produkt aus Dicke und Brechzahl der Präparate gemessen worden war, sollte in dieser Versuchsreihe ein Verfahren gefunden werden, das es ermöglicht, die Brechzahl direkt zu bestimmen.

Nachdem sich, wie bereits erwähnt, das Eiklar aus Hühnerei für derartige Messungen als ungeeignet erwiesen hatte, wurden die Versuche mit verschiedenen Gelatinearten fortgesetzt.

Die zunächst benützten Photoplatten (Dia-Repro normal) wurden zur Entfernung des Halogensilbers aus der Gelatineschicht erst 20 min

lang in 20 %iger Natriumthiosulfatlösung fixiert, dann folgten 5 min in 1,5 %iger Sodalösung und schließlich eine mehrere Stunden dauernde Wässerung. Danach wurden die Photoplatten mit Filtrierpapier abgetrocknet und mit der Gelatineschicht auf das Meßprisma des ABBE-Refraktometers von C. ZEISS aufgedrückt. Nach anschließender Wässerung, 10 min Behandlung in 10 Gew.-%iger PWS und 2 x 5 min Auswaschen in aqua dest. wurde der Meßvorgang mit dem ABBE-Refraktometer wiederholt. Da der hohe Wassergehalt der Gelatine sich störend auf die Konstanz der Brechzahlen auswirkte, kamen die Photoplatten vor der Messung so lange in einen mit Kieselgel und Feuchtigkeitsindikator beschickten Exsikkator, bis sich konstante Brechzahlwerte für die unbehandelte Gelatine ergaben. Bei der Messung der Lichtbrechung dieser Gelatine wurde zum Oberflächenausgleich zwischen Meßprisma des ABBE-Refraktometers und der Gelatineschicht wenige Tropfen Monobromnaphthalin gebracht. Diese Zwischenschicht muß eine höhere Brechzahl als die zu messende Substanz aufweisen, da im ABBE-Refraktometer zur Brechzahlbestimmung der Grenzwinkel der Totalreflexion benützt wird. Gemessen wurde im reflektierten Licht der Natriumdampflampe. Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe 510 Brechzahlmessungen an 170 Präparaten durchgeführt.

Da die Ergebnisse unbefriedigend waren, wurde zunächst anderes Fotomaterial auf seine Brauchbarkeit für diese Versuche geprüft. Die Behandlung und Brechzahlmessung des Positivfilmes, der als nächster Gelatineträger diente, waren identisch mit denjenigen der Dia-Repro normal Photoplatten. Lediglich das Sodabad entfiel.

Die danach verwendete Blatt-Gelatine von Dr. OETKER wurde in aqua dest. zum Quellen gebracht, erwärmt und auf das Meßprisma des ABBE-Refraktometers aufgegossen, um das Monobromnaphthalin zwischen Gelatine und Meßprisma weglassen zu können. Nach 4 Tagen Lufttrocknung wurde die Brechzahl der Gelatine im reflektierten Licht gemessen.

## E. 3.4. Herstellung und Behandlung der Gelatinepräparate

Wie aus den bereits besprochenen Daten und Versuchen deutlich wurde, besitzt man mit einer ausgesuchten, hochwertigen Gelatine ein Modell für kollagenes Bindegewebe, das für Brechzahlmessungen geeignet zu sein scheint. Reproduzierbare Ergebnisse erzielt man jedoch nur durch strenges Einhalten eines standardisierten Behandlungs- und Meßschemas. Die STOESS-Gelatine, die im Gegensatz zu den oben beschriebenen Gelatinen weitgehend homogen ist und im Aufbau dem Kollagen sehr nahe steht, wurde zur Brechzahlmessung im ABBE-Refraktometer folgendermaßen vorbereitet:

Die als Granulat vorliegende Gelatine wurde in kaltem aqua dest. zum Quellen gebracht. Dabei betrug die Gelatinekonzentration 1 bzw. 5 Gew.-%. Die Gelatinelösung wurde langsam auf ca. 45 bis 50° C erwärmt. Nach ungefähr 10 min sonderten sich die entstandenen Gasblasen an der Oberfläche der Flüssigkeit ab. Mit einer Einmalspritze ohne Nadel wurde nun vom Gefäßgrund luftblasenfreie Gelatine aufgezogen und davon auf gut gereinigte Objektträger ein ganz bestimmtes Volumen (0,5 - 1,5 $cm^3$) Gelatine auf eine Fläche von 4,5 x 1,5 cm aufgetragen. Die Gelatinelösung erstarrte auf dem Objektträger. Nach 1 h wurde dieser für die Dauer von 2 h zum Quellen der Gelatine in aqua dest. eingestellt. Danach waren die Präparate zur unterschiedlichen Weiterbehandlung mit PWS bzw. PMS mit oder ohne Fixierung vorbereitet. Nach diesen im folgenden unter 3.5. beschriebenen Weiterbehandlungen trockneten alle Präparate dieser Versuchsreihe ungefähr 2 - 4 Tage bei Zimmertemperatur an der Luft, bis sich konstante Brechzahlen, gemessen an der unbehandelten Gelatine, eingestellt hatten. Die Messung der Brechzahlen wurden im ABBE-Refraktometer bei einer Temperatur von 21° C im reflektierten Licht einer Natriumdampflampe (Wellenlänge 589,3 nm) vorgenommen. Dazu wurde

auf das Meßprisma zum Flächenausgleich wenige Tropfen Monobromnaphthalin gebracht. Der Objektträger wurde mit der Gelatineschicht nach unten zeigend wie ein Deckglas ins Einbettungsmittel auf das Monobromnaphthalin gelegt und die Brechzahl der Gelatine je nach der Streubreite der Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe 3 - 5 Mal bestimmt. Die arithmetischen Mittelwerte aller Meßwerte der Objekte mit gleicher Behandlung wurden in Schaubildern zusammengetragen.

### E. 3.5. Spezielle PWS- bzw. PMS-Behandlung und Auswaschmethode der Gelatinepräparate

a. PWS- bzw. PMS-Aufnahme bei unterschiedlicher Einwirkdauer

Nach dem 2-stündigen Quellen der Gelatine in aqua dest. wurden 150 Präparate zwischen 8 min und 8 Tagen (d) mit 1, 2 und 5 Gew.-%iger PWS bzw. PMS behandelt. Danach wurde die Gelatine kurz in aqua dest. abgespült und je 5 Präparate in eine Standküvette mit 80 $cm^3$ aqua dest. gestellt, welches nach 8, 16 und 30 min gewechselt wurde. Alle Präparate kamen nach 60 min für 17 h in eine große Wanne, worin sich pro Präparat 100 ml aqua dest. als Auswaschflüssigkeit befand. Nach der Lufttrocknung wies die Gelatine eine Dicke von ungefähr 30 µm auf. Einige Präparate (Leerwerte) blieben zur Kontrolle während der Dauer der Behandlung mit PWS bzw. PMS und nachfolgender Auswaschung ohne weitere Behandlung nur im aqua dest. Herstellung, Trocknung und Messung der Gelatinepräparate sind oben unter E. 3.4. beschrieben worden.

b. Brechzahl der Gelatine mit und ohne Formolfixierung

Zusätzlich zu der oben unter a. beschriebenen Behandlung wurden weitere 50 Gelatinepräparate nach der Quellung in aqua dest. 30 min in 10 %iger Formollösung fixiert und anschließend mehrmals in 90 %igem Alkohol und danach in aqua dest ausgewaschen. Alle fol-

genden Behandlungsschritte wurden wie unter a. beschrieben durchgeführt.

c. Auswaschbarkeit der PWS in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Behandlung wurde hier einheitlich auf 20 h Einwirkung einer 5 Gew.-%igen PWS festgesetzt. Nach 5 sec langem Abtropfen der PWS-Lösung kamen je 2 Präparate für 1 h in 60 $cm^3$ aqua dest. bzw. HCL- oder NaOH-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen. Der so erhaltene pH-Wert (zwischen 1 und 10,7) dieser Auswaschlösungen wurde nach Behandlungsende mit dem PHILIPS pH-Wert-Messgerät PR 9404 gemessen. Die Bestimmung der Brechzahl der Gelatine erfolgte wie bereits beschrieben mit dem ABBE-Refraktometer. Die Trockendicke der Gelatineschicht betrug ungefähr 17 µm.

d. Auswaschbarkeit der PWS bei unterschiedlicher Auswaschdauer

Um gleiche Ausgangsbedingungen zu erreichen, wurden 55 Gelatinepräparate mit Ausnahme einiger Kontrollobjekte 16 h in 2 Gew.-%ige PWS getaucht. Die Dauer des Auswaschprozesses der PWS in aqua dest variierte wie folgt: Nur spülen (3 sec), 30 sec, 1, 2, 4, 8, 16 und 30 min, 1, 2,4 h und 5 d. Das aqua dest.wurde nach 3 sec, 10, 20, 40, 80, 160 min, 24 h und 4 d gewechselt. Die Gelatineschichtdicke betrug im Trockenzustand ungefähr 70 µm.

## E. 3.6. Bestimmung der Brechzahl von Gelatine mit der Immersionsmethode

Das hier benützte Prinzip der Immersionsmethode wurde oben unter E. 2.3. angegeben. Dieses Verfahren der Brechzahlbestimmung ermöglicht - im Gegensatz zum ABBE-Refraktometer - auch die Messung der Brechzahl an kleinen histologischen Objektstrukturen. Mit dieser Methode wurden nun die Ergebnisse, die mit dem ABBE-Re-

fraktometer an STOESS-Gelatine gewonnen worden waren, überprüft und die Brechzahl unterschiedlich fixierter und entwässerter STOESS-Gelatine gemessen.

a. Einbettungsmittelgemisch

Zur Variation der Brechzahl des Einbettungsmittels wurden folgende Flüssigkeiten gewählt: Anisol (zur Synthese) von E. MERCK (Code Nr. AN 236) und 1-Bromnaphthalin (zur Synthese), ebenfalls von der Firma E. MERCK (Code Nr. BR 230).

S. BECHER (2) empfahl Anisol als Immersionsflüssigkeit zur orientierenden mikroskopischen Betrachtung bei frischen Präparaten. Verschiedene andere Autoren (BURRI 4, RINNE und BEREK 33) schlugen das 1-Bromnaphthalin zur Durchführung der Immersionsmethode vor.

Als Vorversuch wurde hier die Beeinflussung der Brechzahl des Präparates durch diese beiden Immersionmedien geprüft. Dazu blieb die Gelatine bis zu 24 h in Anisol bzw. Bromnaphthalin oder in deren Gemisch. Anschließend wurde mit dem ABBE-Refraktometer nach bekannter Methode die Brechzahl der Gelatine bestimmt und mit dem Ausgangswert verglichen.

Verwendet man Immersionsmittelgemische aus 2 Komponenten, so ist es von Vorteil, wenn diese eine sogenannte ideale Mischungsreihe darzustellen vermögen, was bedeutet, daß sich der Brechungsindex der Mischungen additiv aus denjenigen der reinen Endglieder berechnen läßt. Hierzu wurden gut untereinandergerührte Gemische ($n = 1,52 - 1,61$) mit verschiedenem Mischungsverhältnis von Anisol und 1-Bromnaphthalin hergestellt und die Brechzahl im ABBE-Refraktometer bei $21^{\circ}$ C gemessen. In dieser Weise ließ sich eine Brechzahlreihe von $n_D = 1,52 - 1,61$ mit einer jeweiligen Differenz von ca. 0,005 herstellen.

b. Einfluß der Fixierung auf die Brechzahl von Gelatine

Um den Bedingungen der histologischen Technik möglichst nahe zu kommen, wurden 36 Gelatinepräparate mit einer Trockendicke von 10 µm wie oben beschrieben hergestellt, luftgetrocknet und anschliessend 30 min in aqua dest. zum Quellen der Gelatine eingestellt. Danach wurden die Präparate in 3 Versuchsreihen wie folgt weiterbehandelt:

1. Serie: 30 min 10 %ige Formolfixierung
3 x 10 min 90 %, 5 min 60 %iger Alkohol
3 x 10 min aqua dest.

2. Serie: 30 min Susafixierung
3 x 10 min 90 %, 5 min 60 %iger Alkohol
3 x 10 min aqua dest.

3. Serie: 30 min Bouinfixierung
3 x 10 min 70 %iger Alkohol
3 x 10 min aqua dest.

Alle Präparate (ausschließlich einiger Kontrollobjekte, welche in aqua dest. blieben) kamen für 90 min in 1 bzw. 5 Gew.-%ige PWS oder PMS. Danach wurden sie 10 min ausgewaschen (6 Präparate/Küvette aqua dest.), je 5 min in 60, 80, 96 %igem Alkohol, 3 x 5 min in absolutem Alkohol entwässert und über Xylol (3 x 5 min) in das Anisol-1-Bromnaphthalingemisch gebracht.

Mit einem Rasiermesser wurde nun ein kleines Stückchen aus der Gelatineschicht geschnitten, auf einen Objektträger gelegt, mehrere Tropfen Einbettungsmittelgemisch darauf gebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Das Mischungsverhältnis Anisol-Bromnaphthalin variierte man so lange, bis unter wiederholter Kontrolle mit Hilfe der Interferenzstreifenverschiebung, der Becke-Linie, des "Halos"

und des Phasenkontrastverfahrens Nullkontrast eingestellt war. Die Brechzahl dieses Einbettungsmittelgemisches wurde mit dem ABBE-Refraktometer bei 589 nm bestimmt und auf 546 nm Wellenlänge umgerechnet (siehe unter "Auswertung"). Der gesamte Meßvorgang wurde bei jedem Objekt 3 Mal wiederholt. Von den Ergebnissen aller Präparate mit gleicher Behandlung wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

Die Betrachtung der Interferenzstreifen erfolgte unter nachstehenden Bedingungen:

Gerät: Durchlicht-Interferenz-Mikroskop
der Firma E. LEITZ
Objektiv: 20 x A 0,35
Okulare: Periplan 10 x
Wellenlänge: 546 nm
Temperatur: 21° C

Untersuchung im Phasenkontrast:

Gerät: ZEISS-Mikroskop Standard GFL
Objektiv: Achromat Ph 10/0,22
Okulare: 12,5 x
Kondensator: Phasenkontrastkondensor II Z
Wellenlänge: 546 nm
Temperatur: 21° C

Im Rahmen dieser Versuche ergab sich gleichzeitig die Möglichkeit zur Kontrolle der Gültigkeit der ABBE-Refraktometermeßwerte in der Form, daß auch die Brechzahl der Präparate der Versuchsreihe 3.5. zusätzlich mit der soeben beschriebenen Immersionsmethode gemessen wurde.

## E. 3.7. Bestimmung der Brechzahl an Muskel- und Kollagenfasern

Hier sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse der vorangegangenen Versuchsreihen auf die Verhältnisse bei histologischen Präparaten übertragen werden können. Dazu wurden 30 Gewebsschnitte zunächst in Xylol gründlich entparaffiniert. Anschließend folgte die absteigende Alkoholreihe bis zum aqua dest., das mehrfach gewechselt wurde. Sowohl die Behandlung mit PWS bzw. PMS als auch das Auswaschen der Säuren richtete sich nach typischem Vorgehen der histologischen Technik (siehe Tab. 3), wobei bezüglich der Behandlungsdauer Mittelwerte genommen wurden.

Für die Gewebsschnitte wurde folgendes Behandlungsschema angewandt: 90 min in 1 oder 5 Gew.-%iger PWS bzw. PMS, kurzes Eintauchen in aqua dest. (2 sec), je 2 Präparate 10 min in 60 $cm^3$ aqua dest., aufsteigende Alkoholreihe (je 3 min in 50, 60, 70, 80, 90, 96 %igem Alkohol) bis zum absoluten Alkohol (3 x 5 min), 1 h in absolutem Alkohol mit Linde Molekularsieb, Type 4A, Körnung 3 mm (SERVA Feinbiochemica) zur vollständigen Entwässerung des Präparates, 3 x 10 min Xylol und letztlich das Anisol-1-Bromnaphthalingemisch.

Einige Präparate (Kontrollwerte) wurden nach der Entparaffinierung sofort in absoluten Alkohol gebracht und die Brechzahl nach dem Durchlaufen der restlichen Behandlungsschritte gemessen.

Tabelle 3: Übersicht über die Art der Behandlung mit PWS bzw. PMS bei verschiedenen Färbemethoden

| Jahr | Methode nach: | insges. Einwirkdauer | Konz.d.PWS/PMS | Auswaschzeit in aqua dest. |
|---|---|---|---|---|
| 1891 | MALLORY | 30 sec | 10 % PMS | 30 min - 1 h |
| 1896 | RIBBERT | 5 sec | 10 % PMS | "kurze Zeit" |
| 1897 | MALLORY | 2 - 24 h | 10 % PWS | keine Angabe |
| 1905 | PASINI | 10 min | 2 % PWS | kurz spülen |
| 1908 | SCHUENINOFF | 20 min - 24 h | 10 % PWS | keine Angabe |
| 1911 | HUETER | 10 - 20 min | 10 % PWS | flüchtiges Abspülen |
| 1915 | HEIDENHAIN | 1/2 - 3 h | 5 % PWS | kurzes Abspülen |
| 1924 | PETERSEN | einige min - 1 h | 5 % PWS/PMS | kurzes Spülen |
| 1929 | WALTER | 10 min | 2 % PWS | kurzes Spülen |
| 1929 | MASSON | 10 min | 1 % PMS | 1 - 30 min |
| 1930 | v. VOLKMANN | 1 h - mehrere h | 5 % PWS | direkt in alk. abs. |
| 1930 | WALLART/HOUETTE | 10 min | 1 % PWS | 5 - 30 min |
| 1933 | DOMAGK | 5 min | 1 % PMS | kurz abspülen |
| 1937 | CROSSMON | bis Kollagen farblos | 1 % PWS/PMS | kurz abspülen |
| 1938 | GOLDNER | 15 sec - 30 min | 3 - 5 % PWS/PMS | kurz abspülen |
| 1942 | PAPANICOLAOU | 2 min | 1 - 10 % PWS | kurz spülen |
| 1950 | CASON | 5 min | 0,5 % PWS | 3 - 5 sec |
| 1963 | SPECHT | 1 - 3 h | 5 % PWS | kurzes Abspülen |

Die Messung der Brechzahl mit der Immersionsmethode wurde, wie im letzten Versuch beschrieben, im Durchlicht-Interferenz-Mikroskop und im Phasenkontrast realisiert. Von jeder Meßstelle wurde 5 mal die Brechzahl bestimmt und die durchschnittlichen Ergebnisse pro Meßstelle berechnet. Von den dadurch erhaltenen Durchschnittsergebnissen für die einzelnen Meßstellen wurde wiederum das arithmetische Mittel für alle gemessenen Objektstrukturen mit gleicher Behandlung gebildet. Alle Messungen an den Muskelfasern wurden am hellen, isotropen I-Streifen durchgeführt, um Fehlmessungen bei der Anwendung des wie Polarisationsanordnungen arbeitenden Interferenzverfahrens nach JAMIN-LEBEDEFF zu vermeiden.

### E. 3.8. Photos

Abschließend wurden die optischen Auswirkungen der Brechzahländerung verschiedener histologischer Präparate durch die Behandlung mit PWS bzw. PMS mikrophotographisch festgehalten. Dazu wurden von 1 - 2 Stellen der in Tabelle 4 aufgeführten Objekten je 3 Photos vor und nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS mit verschiedenen Belichtungszeiten angefertigt.

Tabelle 4: Behandlung der photographierten Präparate

| Objekt | Fixierung | Behandlung |
|---|---|---|
| quergestreifte Muskelfasern (Mensch) | Formol | 5 % PWS |
| | Formol | 5 % PMS |
| Oesophagus (Frosch) | Formol | 5 % PWS |
| Niere (Ratte) | Fix. nach LILLIE | 5 % PMS |
| Milz und Niere (Ratte) | Formol | 5 % PWS |
| Leber (Ratte) | Äthanol | 5 % PWS |
| Leber (Ratte) | Fix. nach GENDRE | 5 % PWS |
| Mammatumor (Ratte) | Bleiacetat | 5 % PMS |
| Mammatumor (Ratte) | Formol | 5 % PMS |
| Magen (Ratte) | Fix. nach CARNOY | 5 % PWS |
| Pankreas (Ratte) | Fix. nach LILLIE | 5 % PWS |

Die formolfixierten Präparate der quergestreiften Muskulatur stammen aus der Versuchsreihe 3.7.

Bei der Fixierung nach LILLIE handelt es sich um durch Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat neutrales, gepuffertes Formol (ROMEIS 34).

Die Fixierung nach GENDRE erzielt eine gute Glykogenfixierung. Das Gemisch enthält 80 ml 90 %igen Alkohol, gesättigt mit Pikrinsäure, 15 ml 40 %iges Formol und 5 ml Eisessig (ROMEIS 34).

Die CARNOY'sche Fixierungslösung besteht aus einem Gemisch aus 60 ml Äthanol, 30 ml Chloroform und 10 ml Eisessig (ROMEIS 34).

Die einzige hier untersuchte Schwermetallfixierung war diejenige mit Bleiacetat.

Folgende Behandlungsschritte bauten auf dem fixierten und ungefärbten Zustand der Paraffinschnitte auf:

Entparaffinierung in Xylol
absteigende Alkoholreihe bis ins aqua dest.
Einbettung in W 15
Photo (Objektlage und Fokussierung notieren)
Abspülen des Einbettungsmittels
20 min in 5 Gew.-%ige PWS bzw. PMS
kurzes Eintauchen (3 sec) in aqua dest.
je 2 Präparate 5 min in 60 $cm^3$ aqua dest.
Einbettung in W 15
Photo derselben Struktur und bei möglichst
gleicher Fokussierung wie bei 1. Aufnahme.

Alle photographischen Aufnahmen wurden wie folgt durchgeführt:

| | |
|---|---|
| Film: | Agfapan 25 |
| Gerät: | Photomikroskop II von C. ZEISS |
| Objektiv: | Plan 40/0,65 Ph |
| Optovar: | 1,25 (ergibt Negativmaßstab 160 : 1) |
| Kondensor: | Phasenkontrast-Kondensor II Z |
| Wellenlänge: | 546 nm |

### E. 3.9. Dickenbestimmung der Gelatineschicht

Die Gelatinedicke beeinflußte bei den vorangegangenen Versuchen E. 3.5. und E. 3.6. die Ergebnisse entscheidend. Bei konstanter Diffusionsgeschwindigkeit der PWS bzw. PMS ist für die Durchdringung dieser beiden Säuren innerhalb einer bestimmten Zeitdauer die Schichtdicke der Gelatine ausschlaggebend. Deshalb wurde hier eine Methode entwickelt, die es gestattet, die Dicke der Gelatine ohne Eingriffe am Präparat zu bestimmen.

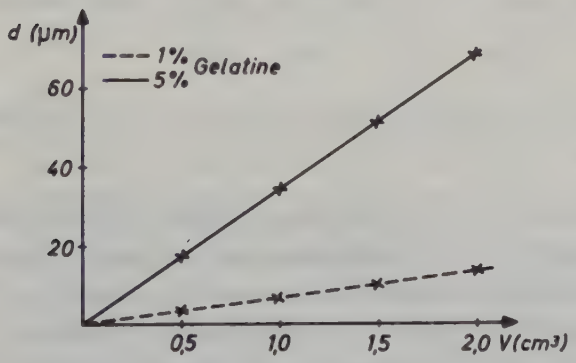
Berechnung der Gelatineschichtdicke:

Geht man davon aus, daß die STOESS-Gelatine, die hier Verwendung fand, nach Lufttrocknung noch eine Feuchtigkeit von ca. 9,8 % besitzt, dabei ein spezifisches Gewicht von ungefähr 1,3 $g/cm^3$ (WUNDERLICH 45) aufweist und das aufgegossene Volumen der 1 bzw. 5 Gew.-%igen Gelatinelösung einschließlich der gleichmäßig aufgegossenen Fläche bekannt ist, so läßt sich die Dicke der Gelatine nach Lufttrocknung nach folgender Gleichung ungefähr berechnen:

$$\text{Dicke} = \frac{\text{aufgetragene Masse der luftgetrockneten Gelatine}}{\text{ausgegossene Fläche x spez. Gewicht d. Gelatine}}$$

Die berechnete Dicke wurde dadurch kontrolliert, daß aus der Gelatineschicht ein Keil herausgeschnitten und dann im Mikroskop die Schichtdicke durch Fokussierung auf den Grund des so entstandenen Grabens sowie anschließend auf die Oberfläche der Gelatineschicht bestimmt wurde, wobei die Dicke an der Mikrometereinteilung des Feintriebes für das Objektiv abgelesen wurde (BURRI 4, RINNE und BEREK 33).

Abb. 1: Dicke der Gelatineschicht




d = Dicke der lufttrockenen Gelatine
V = Volumen der ausgegossenen Gelatine

# F. AUSWERTUNG

## F. 1. UMRECHNUNG DER BRECHZAHLEN DER GELATINE AUF GLEICHE AUSGANGSWERTE

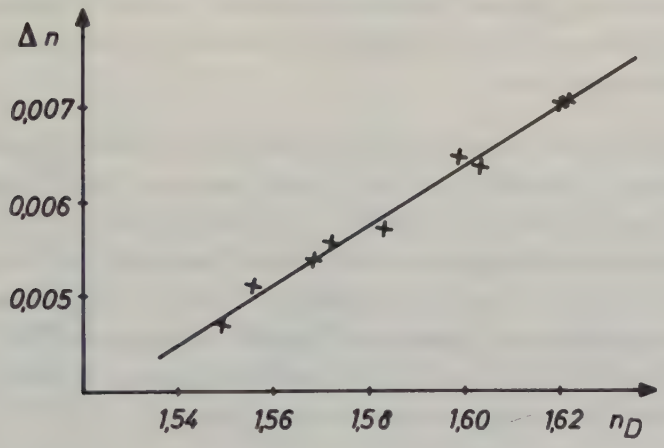
Nach der Lufttrocknung wiesen die unbehandelten Gelatinepräparate keine konstanten Brechzahlen auf, da der Wassergehalt der Gelatine stark von der Luftfeuchtigkeit abhängt. Versuche ergaben jedoch, daß in der letzten Phase der Trocknung (bei Kontrollwerten unter $n_D = 1,545$), unabhängig von der weiteren Dauer der Trocknung, die Brechzahldifferenz von behandelten und unbehandelten Präparaten konstant blieb. Deshalb wurden alle Ergebnisse auf den durchschnittlich erreichten Trockenendwert der unbehandelten Gelatine ($n_D = 1,543$) umgerechnet. Dazu wurde vor, zwischen und nach allen Meßreihen die durchschnittliche Brechzahl der Kontrollpräparate ermittelt. Zu allen Meßwerten einer Versuchsreihe wurde dann die Brechzahldifferenz des zugehörigen durchschnittlichen Kontrollwertes gegenüber $n_D = 1,543$ zugezählt oder abgezogen. Nur so erhielt man vergleichbare Resultate.

## F. 2. UMRECHNUNG DER ERGEBNISSE VON WELLENLÄNGE 589 nm AUF 546 nm

Wie bereits beschrieben, wurde die Brechzahl aus technischen Gründen im ABBE-Refraktometer bei einer Wellenlänge von 589 nm, bei allen anderen hier verwendeten Geräten bei 546 nm gemessen. Um bei der Immersionsmethode (E. 3.6. und 3.7.) die Brechzahl der Präparate angeben zu können, wurde die Brechzahl des Einbettungsmittelgemisches aus Anisol und 1-Bromnaphthalin im ABBE-Refraktometer bei 589 nm bestimmt. Um diese Ergebnisse auf 546 nm Wellenlänge umrechnen zu können, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Die Brechzahlen unterschiedlich lichtbrechender Gemische aus Anisol-1-Bromnaphthalin wurden mittels Interferenzfilter im ABBE-Refraktometer bei einer Wellenlänge von 589 nm und 546 nm gemessen. Aus der Differenz der bei 546 nm gemessenen Brechzahl gegenüber derjenigen, die sich bei 589 nm ergab, wurde durch Addition des für das benützte ABBE-Refraktometer für Messungen bei n = 546 nm geltenden spezifischen Korrekturwerts (RATH 30, ZEISS 48) der definitive Korrekturwert $\Delta_n$ ermittelt, dessen Abhängigkeit von $n_D$ in Abb. 2 dargestellt ist.

Abb. 2: Korrekturwerte für die Umrechnung von Brechzahlen bei 589 nm auf 546 nm Wellenlänge




$n_D$ = Brechzahl des Anisol-1-Bromnaphthalin-Gemisches, gemessen bei einer Wellenlänge von 589 nm und 21 °C

$\Delta_n$ = Definitive Korrekturwerte für $n_D$-Werte, die auf 546 nm Wellenlänge umgerechnet werden sollen

$n_E$ = Brechzahl bei 546 nm Wellenlänge

$= n_D + \Delta n$

Abbildung 2 ist nur gültig für Anisol-1-Bromnaphthalingemisch bei 21° C für die Umrechnung der Brechzahlen bei 589 nm auf 546 nm Wellenlänge. Zu den im ABBE-Refraktometer bei 589 nm gemessenen Brechzahlen wurde der dazugehörige Korrekturwert aus der Abbildung 2 entnommen und addiert.

## F. 3. MESSWERTE

Alle Einzelergebnisse einer mehrfach gemessenen Objektstelle wurden zunächst gemittelt. Aus allen diesen Durchschnittswerten, die an Präparaten mit gleicher Behandlung gewonnen wurden, wurde dann nochmals das arithmetische Mittel gebildet und in die Tabellen und Abbildungen eingetragen.

Die gebräuchlichsten Streuungsmaße bei quantitativen Merkmalen sind die Varianz, die Standardabweichung und die Spannweite. Diese Kenngrößen geben die Streuung der Meßwerte um den Mittelwert an. Da es bei den vorliegenden Meßergebnissen keine "Ausreißer" gab, wurde hier zur Charakterisierung der Präzision der Meßwerte die anschauliche Ausdrucksform der "Spannweite" gewählt. Die Spannweite ist die Differenz der beiden durch gleiche Behandlung zusammengehörigen Daten mit dem größten und dem kleinsten Wert.

# G. ERGEBNISSE

## G. 1. PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON PWS BZW. PMS

Abb. 3: Brechzahlen unterschiedlich konzentrierter PWS bzw. PMS

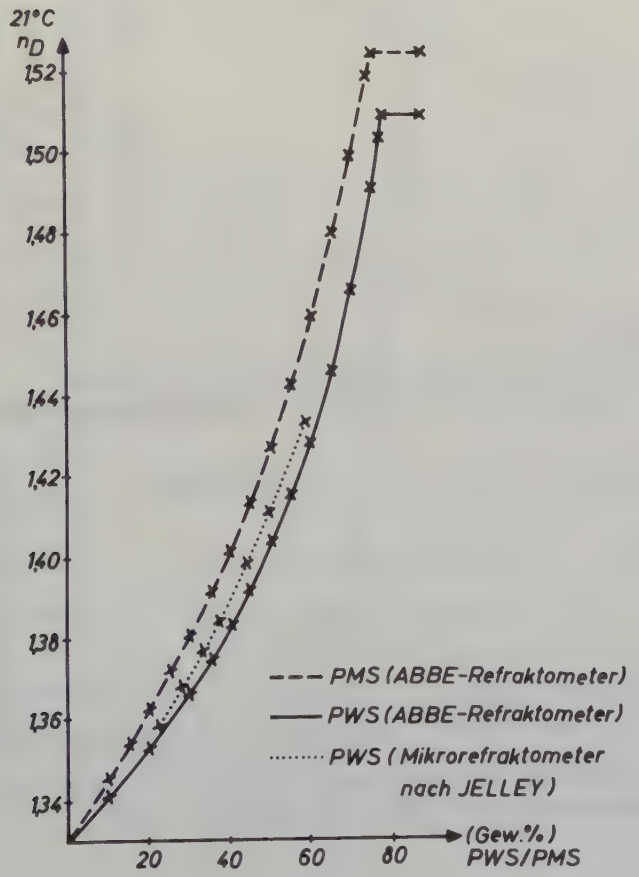
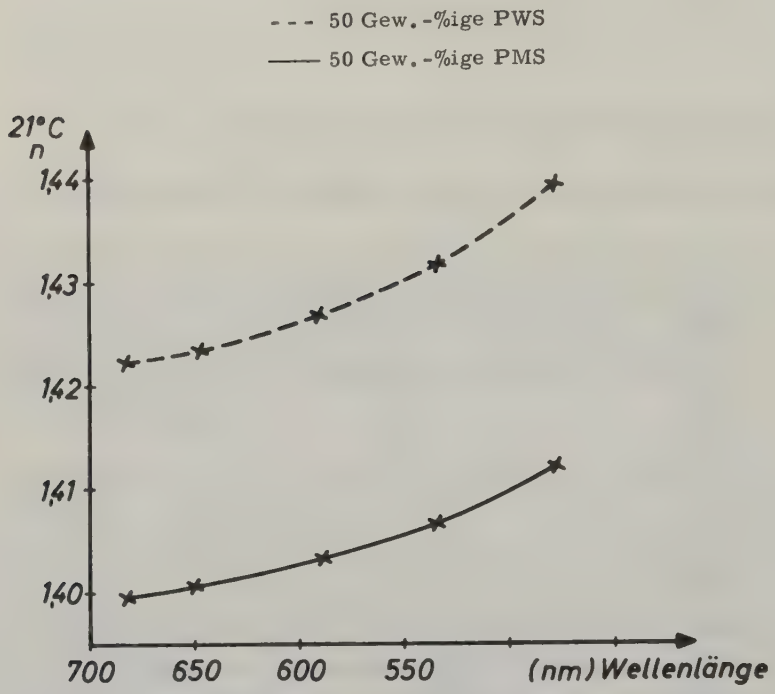


Abb. 4: Dispersion der PWS bzw. PMS




Die Dispersion $\nu_e = \frac{n_e - 1}{n_{F'} - n_{C'}}$ (nach DIN 58884)

beträgt also: $\nu_e$ = 37,9 für 50 Gew.-%ige PWS

$\nu_e$ = 28,7 für 50 Gew.-%ige PMS

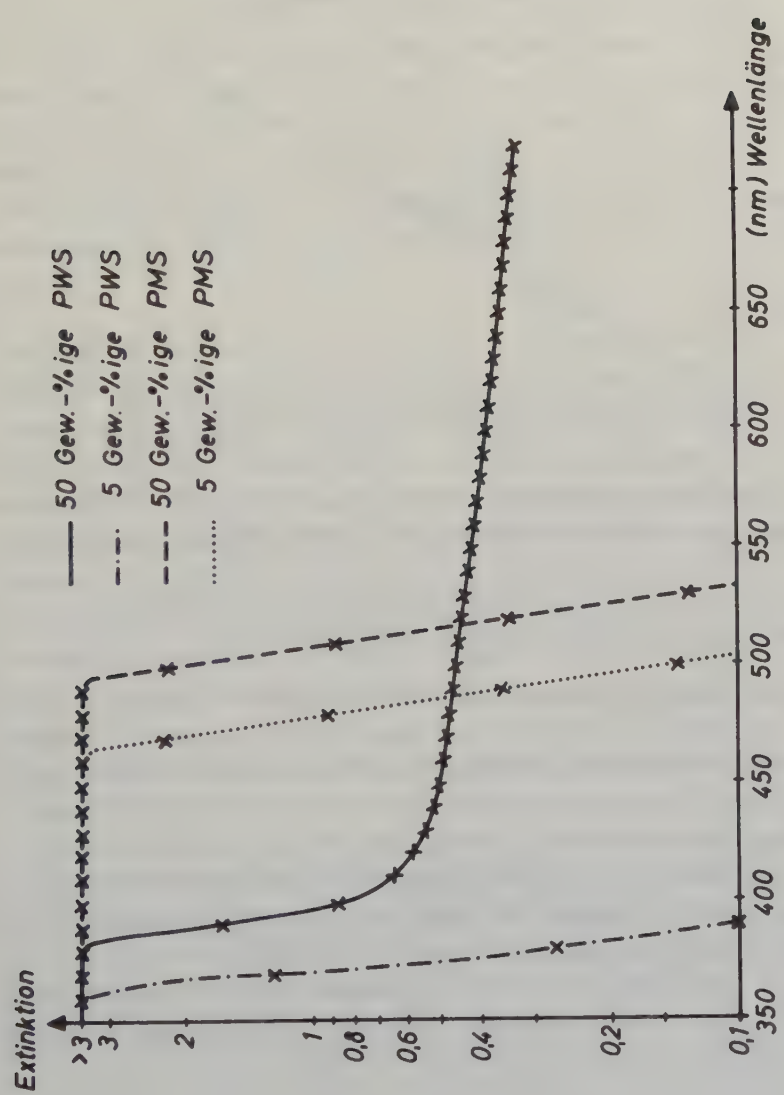
$\nu_e$ = Dispersion bei 546,07 nm Wellenlänge

$n_e$ = Brechzahl für Licht der grünen Quecksilberlinie (546,07 nm)

$n_{F'}$ = Brechzahl für Licht der Kadmiumlinie (479,99 nm)

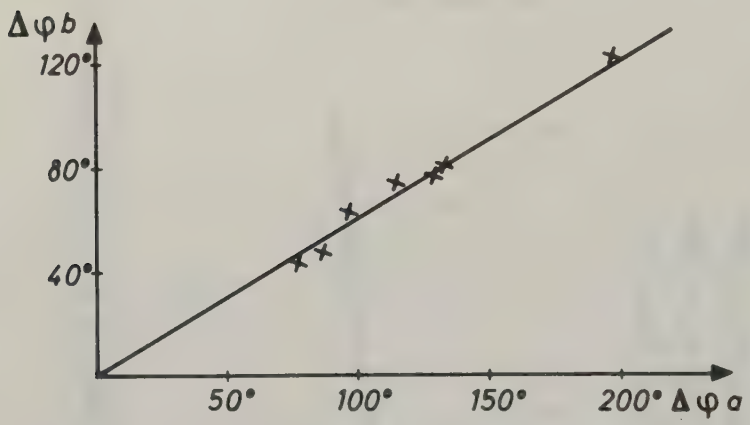
$n_{C'}$ = Brechzahl für Licht der Kadmiumlinie (643,85 nm)

Abb. 5: Absorptionsspektren der PWS bzw. PMS



G. 2. OPTISCHE DICHTE

Abb. 6: Änderung der optischen Dichte durch PWS-Behandlung von gallertigem Bindegewebe der Nabelschnur




a. Die Abzisse zeigt die Phasendifferenz $\Delta\varphi_a$ zwischen Einbettungsmittel und gemessener Objektstruktur in unbehandeltem Zustand.

b. Die Ordinate zeigt die durch die PWS hervorgerufene Phasenverschiebung $\Delta\varphi b$ gegenüber dem unbehandelten Präparat.

Die Spannweite der Einzelergebnisse beträgt 6 Grad.

Beim 2. Phasenpräparat (Erythrozyten, Mensch) dieser Versuchsreihe konnte sowohl bei der Formolfixierung als auch bei der Methanolfixierung keine nennenswerte Erhöhung der Phasenverschiebung gegenüber dem Umfeld nach der Behandlung mit PWS gefunden werden. Die durchschnittliche Erhöhung der Phasenverschiebung von 26 Objekten ergab 1 Grad (entspricht etwa 1,5 nm).

## G. 3. VORVERSUCHE ZUR MESSUNG DER BRECHZAHL

Die Brechzahlmessung an der Gelatineschicht der Photoplatten ergab im ungetrockneten Zustand eine Erhöhung der Brechzahlen durch die Behandlung mit PWS um durchschnittlich 0,007. Infolge des unvermeidlichen unterschiedlichen Wassergehaltes war jedoch weder die unbehandelte noch die behandelte Gelatine bezüglich ihrer Brechzahl konstant. Weiterhin wurde bei der Gelatine nach der Behandlung mit PWS eine wesentliche Minderung der Fähigkeit, Wasser aufzunehmen, beobachtet.

Auch nach der Trocknung der Gelatineschicht der Photoplatten im Exsikkator ergaben sich keine konstanten, reproduzierbaren Brechzahlwerte. Die Grenzlinie der Totalreflexion (= Ableselinie) im ABBE-Refraktometer war dermaßen unscharf und schwach ausgeprägt, oder es erschienen mehrere Grenzen, so daß es kaum möglich war, die Brechzahl abzulesen. Zum Teil wurden bei Brechzahlen von 1,6 noch verschwommene Schatten von möglichen Grenzen wahrgenommen. Bei den Präparaten konnte man nach der Behandlung bereits mit dem unbewaffneten Auge deutlich "Verschmutzungen" erkennen (grauweiße Schleier), die die Gelatineschicht inhomogen erscheinen ließen. Überdies waren in den Präparaten kristalline Strukturen zu erkennen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit als Natriumthiosulfatkomplexe zu deuten waren.

Bei den Versuchen mit dem Positivfilm und der Dr. OETKER Blatt-Gelatine ergab sich eine Brechzahl für die unbehandelte Gelatine von 1,54. Auch in diesen beiden Fällen war die Ableselinie im ABBE-Refraktometer so schwach ausgeprägt, daß von einer Behandlung dieser Gelatinearten mit PWS oder PMS abgesehen wurde.

## G. 4. EINFLÜSSE VERSCHIEDENER BEHANDLUNGSMETHODEN AUF DIE BRECHZAHL VON STOESS-GELATINE

Wie schon oben angedeutet, ließ die PWS- bzw. PMS-Behandlung die Gelatine spröder und härter werden, als dies ohne diese Behandlung der Fall wäre. So ergab die Quellung einer behandelten Gelatine in Wasser keine gallertige, sondern eine knorpelige Festigkeit der Gelatine. Nach sehr langer PWS- bzw. PMS-Behandlung konnte es sogar vorkommen, daß die Gelatine bei der Trocknung unter einer solchen Spannung stand, daß Glasteile vom Objektträger durch selbständiges Abheben der Gelatine herausgerissen wurden.

Eine unterschiedliche Quelldauer der Gelatine verursachte bei sonst gleicher Behandlung verschiedene Brechzahlen.

Bei den Messungen der Gelatine im ABBE-Refraktometer ergaben sich mehrere Grenzlinien, die wie Interferenzstreifen aussahen. Eine durch das Monobromnaphthalin hervorgerufene Interferenzstreifenerscheinung konnte dadurch ausgeschlossen werden, daß die Streifen beim Verkippen des Präparates weder divergierten noch sich sonst in irgendeiner Weise verschoben. Der 1. und 2. Grenzstreifen konnte abwechselnd, je nach Stellung eines Polarisationsfilters, zum Verschwinden gebracht werden. Die Brechzahldifferenz dieser beiden polarisationsabhängigen Grenzstreifen ergab äußerst konstant 0,0035. Im folgenden wird nur der höhere Brechzahlwert angegeben. Eigenartig war auch die Feststellung, daß Gelatinepräparate, die im ABBE-Refraktometer eine Polarisationsabhängigkeit der Brechzahl (Doppelbrechung) aufwiesen, im Polarisationsmikroskop keinerlei Vorzugsfaserrichtung zeigten. Die übrigen 5 - 10 Grenzlinien konnten als HERSCHELsche Streifen (s. Abschnitt H. 2.3.) identifiziert werden (persönl. Mitteilung von Dipl.-Phys. J. RIENITZ, Inst. f. Wiss. Mikroskopie, Tübingen).

Abb. 7: PWS-Aufnahme bei unterschiedlicher Einwirkdauer
(halblogarithmische Darstellung)

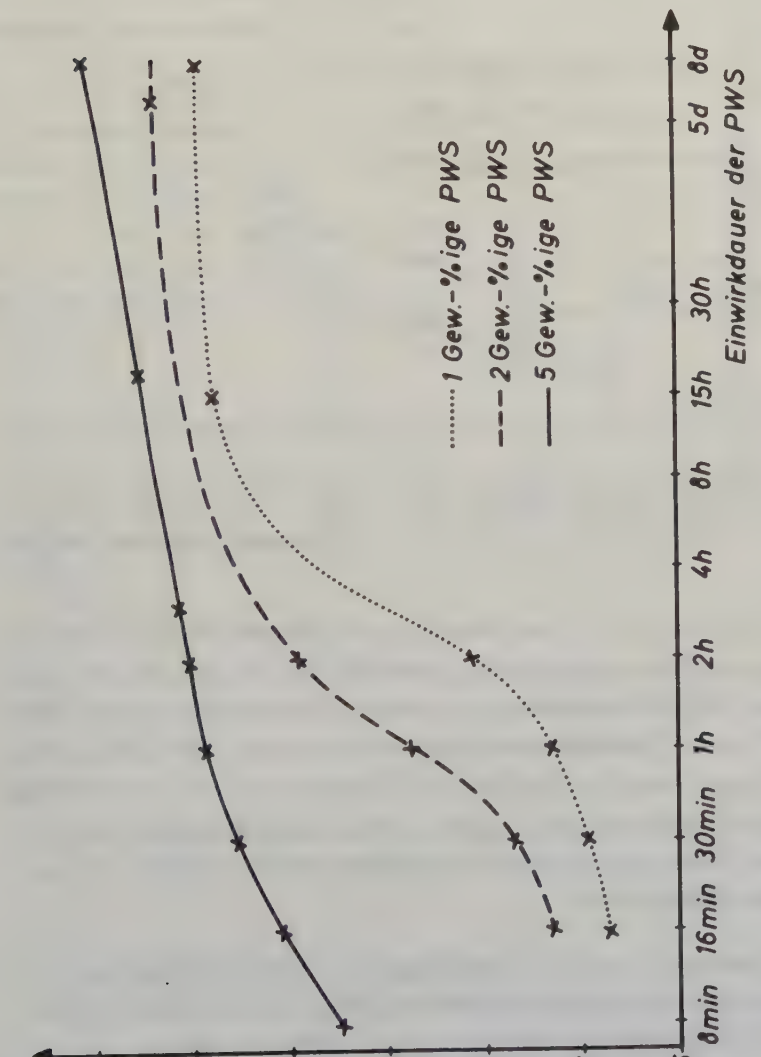
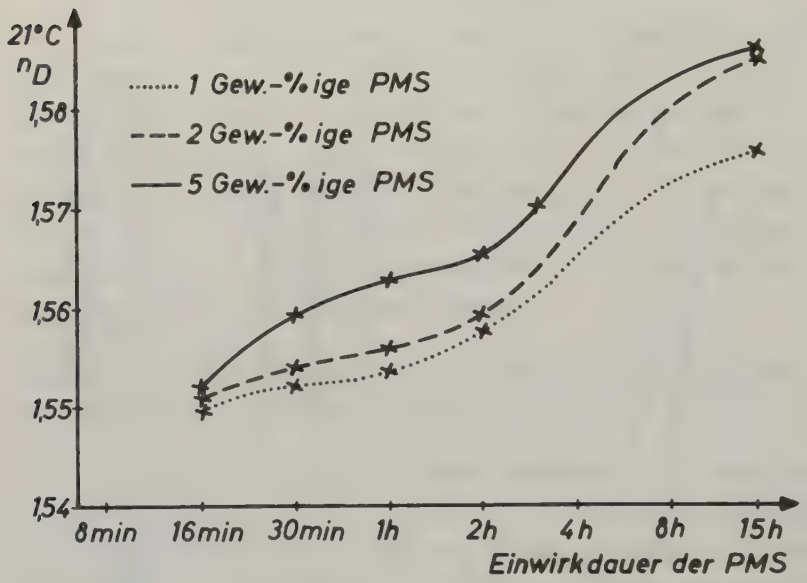


Abb. 8: PMS-Aufnahme bei unterschiedlicher Einwirkdauer (halblogarithmische Darstellung)



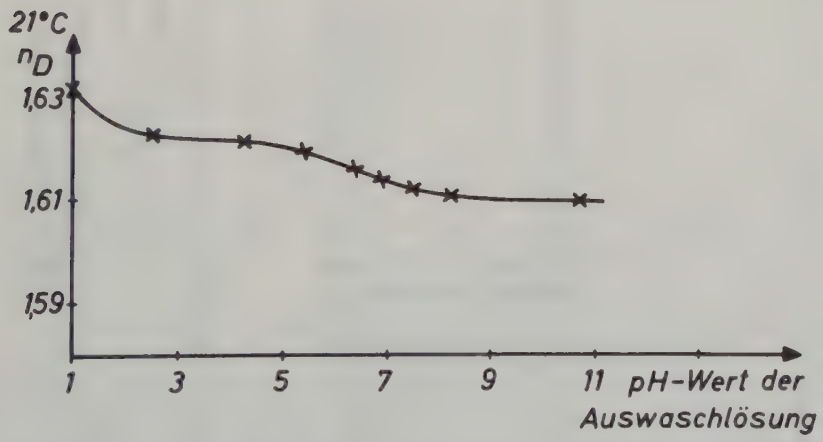

Die Überprüfung der Auswirkung von kürzerer oder längerer Einwirkdauer stieß auf meßtechnische Schwierigkeiten, da sich dann die Grenzlinien im ABBE-Refraktometer zunehmend undeutlicher zeigten. Neben der im Teil "Versuchsanordnungen" beschriebenen Anzahl der Gelatinepräparate, deren durchschnittliche Brechzahlwerte hier eingezeichnet sind, wurden zusätzlich weitere ca. 400 Gelatinepräparate hergestellt, die z. T. als Kontrollobjekte dienten oder deren Brechzahl nicht zu messen war.

Die Spannweite der in den Abbildungen 7 - 10 und in Tabelle 5 als Durchschnittsergebnisse dargestellten Brechzahlen liegt bei 0,0028, wobei die Meßwertstreuung meist sogar unter 0,001 blieb.

Tabelle 5: Vergleich der Brechzahlen von Gelatine mit und ohne Formolfixierung

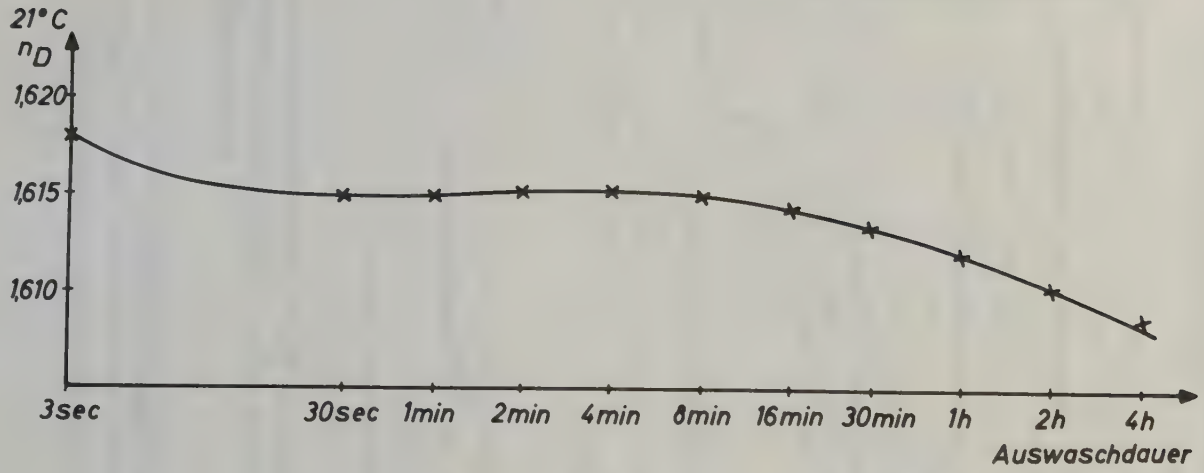
| Behandlung der Gelatine | $n_D^{21^\circ C}$ mit Formolfixierung | $n_D^{21^\circ C}$ ohne Formolfixierung |
|---|---|---|
| ——— (Kontrollwerte) | 1,543 | 1,543 |
| 30 min 5 Gew.-%ige PMS | 1,552 | 1,554 |
| 1 h 5 Gew.-%ige PMS | 1,554 | 1,556 |
| 30 min 5 Gew.-%ige PWS | 1,591 | 1,596 |

Abb. 9: Auswaschbarkeit der PWS in Abhängigkeit vom pH-Wert




Der pH-Wert der 5 Gew.-%igen PWS lag bei 1.

Abb. 10: Auswaschbarkeit der PWS bei variabler Auswaschdauer (halblogarithmische Darstellung)




Ergänzungen zu Abb. 10: Wurden die Präparate überhaupt nicht ausgewaschen, so stellte sich eine durchschnittliche Brechzahl von 1,616 ein. Nach 30 min Auswaschzeit begann die Brechzahl langsam von 1,6136 bis auf etwa 1,586 nach 5 Tagen Wässerung abzusinken, wobei die Brechzahl der Präparate zunehmend schwieriger zu messen war.

## G. 5. BRECHZAHL DER GELATINE NACH DER IMMERSIONSMETHODE

Die STOESS-Gelatine zeigte im ABBE-Refraktometer vor und nach der Behandlung mit dem Anisol-1-Bromnaphthalingemisch dieselbe Brechzahl. Es darf deshalb angenommen werden, daß diese Immersionsmedia keinen verfälschenden Faktor in die Ergebnisse einbringen.

Abb. 11: Brechzahlen des Anisol-1-Bromnaphthalingemisches

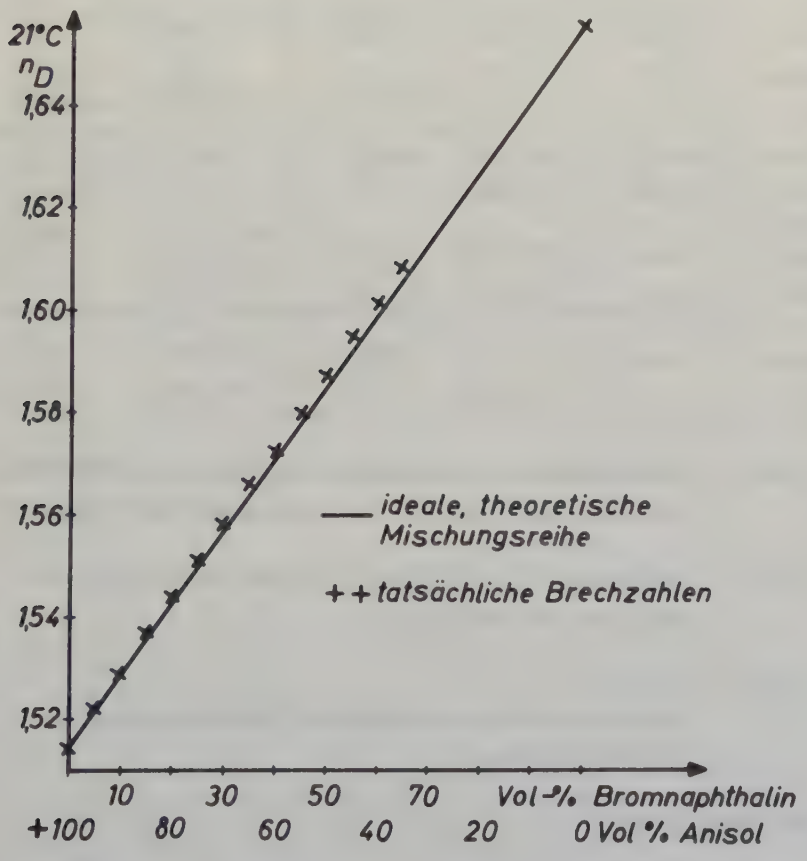


Tabelle 6: Brechzahlen der mit PWS bzw. PMS behandelten, entwässerten STOESS-Gelatine nach verschiedenen Fixierungen

| Fixierung | $n_E$ (unb.) | Behandlung | $n_E$ (beh.) | $n_E$ (beh.) - $n_E$ (unb.) |
|---|---|---|---|---|
| Formol | 1,555 | 1 % PWS | 1,599 | 0,044 |
| Formol | 1,555 | 5 % PWS | 1,599 | 0,044 |
| Susa | 1,561 | 1 % PWS | 1,599 | 0,038 |
| Susa | 1,561 | 5 % PWS | 1,606 | 0,045 |
| Bouin | 1,558 | 1 % PWS | 1,600 | 0,042 |
| Bouin | 1,558 | 5 % PWS | 1,604 | 0,046 |
| Formol | 1,555 | 1 % PMS | 1,617 | 0,062 |
| Formol | 1,555 | 5 % PMS | 1,617 | 0,062 |
| Susa | 1,561 | 1 % PMS | 1,607 | 0,046 |
| Susa | 1,561 | 5 % PMS | 1,607 | 0,046 |
| Bouin | 1,558 | 1 % PMS | 1,615 | 0,057 |
| Bouin | 1,558 | 5 % PMS | 1,615 | 0,057 |

$n_E$ (unb.): Brechzahl eines Präparates ohne Behandlung mit PWS bzw. PMS, gemessen bei einer Wellenlänge von 546 nm.

$n_E$ (beh.): Brechzahl der mit PWS bzw. PMS behandelten Präparate bei 546 nm Wellenlänge.

$n_E$ (beh.) - $n_E$ (unb.):
Brechzahlerhöhung der behandelten Präparate gegenüber den Kontrollwerten.

Spannweite: 0,0025

Die Brechzahlen aus Abb. 7 - 10 und Tabelle 5, die mit dem ABBE-Refraktometer gemessen worden waren, konnten mit der Immersionsmethode bestätigt werden. Von der eigenartigen Doppelbrechung der Gelatine, die unter G. 4. beschrieben wurde, blieb bei der Anwendung der Immersionsmethode lediglich der obere Brechzahlwert bestehen. Der tiefere Wert konnte in keinem Versuch gemessen werden.

## G. 6. BRECHZAHL DER MUSKEL- UND KOLLAGENFASERN

Tabelle 7: Brechzahlen der Kollagenfasern

| $n_E$ (unbeh.) | Behandlung | $n_E$ (beh.) | $n_E$ (beh.) - $n_E$ (unb.) |
|---|---|---|---|
| 1,543 | 1 % PWS | 1,581 | 0,038 |
| 1,543 | 5 % PWS | 1,591 | 0,048 |
| 1,543 | 1 % PMS | 1,592 | 0,049 |
| 1,543 | 5 % PMS | 1,600 | 0,057 |

Abgekürzte Bezeichnungen siehe Tabelle 6.

Spannweite: 0,0025

Tabelle 8: Brechzahlen der quergestreiften Muskelfasern

| $n_E$ (unbeh.) | Behandlung | $n_E$ (beh.) | $n_E$ (beh.) - $n_E$ (unb.) |
|---|---|---|---|
| 1,535 | 1 % PWS | 1,569 | 0,034 |
| 1,535 | 5 % PWS | 1,580 | 0,045 |
| 1,535 | 1 % PMS | 1,592 | 0,057 |
| 1,535 | 5 % PMS | 1,605 | 0,070 |

Abgekürzte Bezeichnungen siehe Tabelle 6.
Spannweite: 0,0020

Die Messungen dieser Versuchsreihe wurden nach 3 Monaten Pause wiederholt, die Ergebnisse dieser ersten Versuchsreihe wurden durch diese Wiederholung bestätigt.

Hierbei wurde anfangs nichtso lange entwässert wie beim ersten Versuchsdurchgang. Man erhielt zwar durchweg niedrigere Brechzahlen als zuvor, die Differenz der Brechzahlen vor und nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS ergab jedoch das alte Ergebnis.

## G. 7. MIKROPHOTOGRAPHISCHE AUSWERTUNG

Die im Abschnitt "Fragestellung" geschilderten Erscheinungen an histologischen Objekten, die mit PWS bzw. PMS behandelt worden sind, werden teilweise auf den nachfolgenden mikrophotographischen Aufnahmen sichtbar.

Es kann regelmäßig festgestellt werden, daß Strukturen, die vor der Behandlung mit PWS bzw. PMS in positivem Phasenkontrast äußerst dunkel erscheinen, d. h. bei denen der Gangunterschied der betreffen-

den Struktur gegenüber dem Einbettungsmittel einen optimalen positiven Bildkontrast bewirkt, nach der Einwirkung von PWS bzw. PMS einesteils in positivem, anderenteils in negativem Bildkontrast erscheinen. Dabei ist meist das Zentrum der Präparatstruktur hell (Wandlung von positivem zu negativem Bildkontrast), der Rand, der meist eine geringere Phasenverschiebung als das Zentrum gegenüber dem Einbettungsmedium aufweist, dunkel. Auf diese Art und Weise täuscht z. B. eine mit PWS bzw. PMS behandelte, kugelförmige Gewebsstruktur bei der Betrachtung im positiven Phasenkontrast eine ringförmige Gestalt vor. Handelt es sich um Strukturen, die an den Rändern nicht dünner werden und die bereits in unbehandeltem Zustand im Bereich des optimalen positiven Bildkontrastes liegen, so besteht die Möglichkeit, daß diese durch die Behandlung mit PWS bzw. PMS eine derartige Phasendifferenz gegenüber dem Einbettungsmittel erfahren, daß daraus ein verminderter positiver Bildkontrast resultiert und die Struktur unscharf grau dargestellt wird oder sich diese bei Null- bzw. negativem Kontrast nicht mehr vom Einbettungsmedium abhebt und so als "Halo" fehlgedeutet wird. Selbst scheinbare Größenänderungen einer Präparatstruktur können auf diese Weise entstehen und erklärt werden.

Sehr feine Strukturen hingegen weisen ohne PWS- bzw. PMS-Behandlung eine so niedrige Differenz der optischen Dichte gegenüber dem umgebenden Medium auf, daß sie hier auf den Photos nur verschwommen grau dargestellt sind, d. h. einen geringen positiven Bildkontrast aufweisen. Werden diese Präparatanteile jedoch mit PWS bzw. PMS behandelt, so erkennt man scharf begrenzte, dunkle Gebilde als Folge der Erhöhung der Phasendifferenz (siehe Abb. 12).

Insgesamt bewirkt die PWS- bzw. PMS-Behandlung histologischer Präparate gegenüber solchen ohne die Einwirkung dieser Substanzen, daß bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung sehr viel mehr Struktureinzelheiten sichtbar werden, die Bilder kontrastreicher und

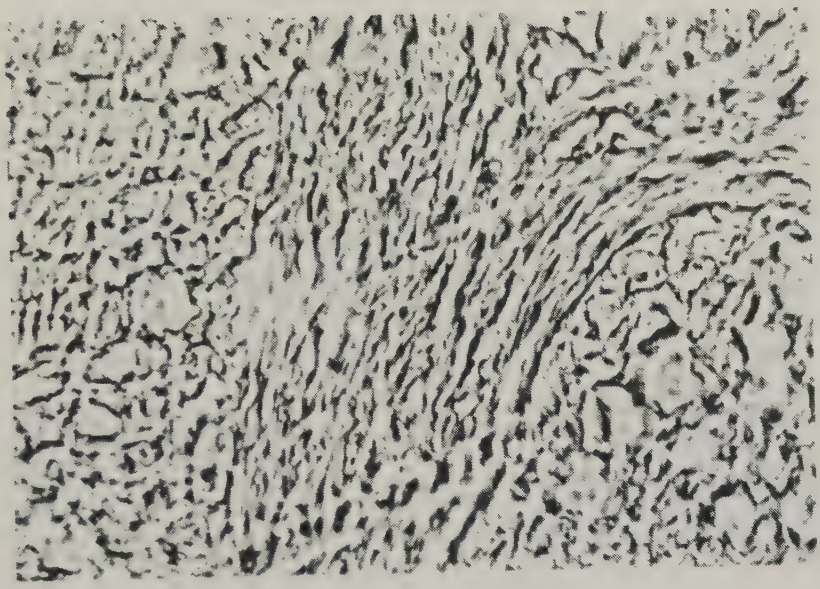
schärfer erscheinen, aber auch viele Pseudostrukturen entstehen oder manche Gebilde eines Präparates unsichtbar werden können.

Abb. 12: Oesophagus (Frosch) ohne PWS- bzw. PMS-Behandlung (nebenstehende obige Abbildung)

Das mit Formol fixierte histologische Präparat weist bereits vor der Einwirkung von PWS bzw. PMS einen überwiegend hohen, positiven Bildkontrast auf.

Abb. 13: Dasselbe Präparat wie in Abb. 12, jedoch 20 min Einwirkung von 5 Gew.-%iger PWS (nebenstehende untere Abbildung)

Nach Behandlung des in Abb. 12 wiedergegebenen Präparates mit 5 Gew.-%iger PWS zeigt sich hier vor allem im Zentrum der gröberen Gewebsstrukturen ein Übergang von positivem zu negativem Bildkontrast, wodurch die abgebildeten Strukturen fälschlicherweise als hohlkörperartig interpretiert werden könnten.



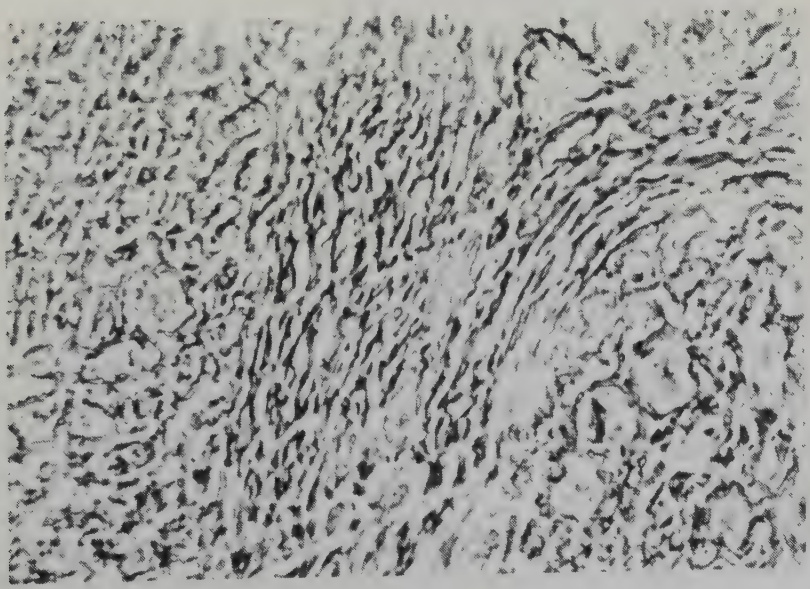
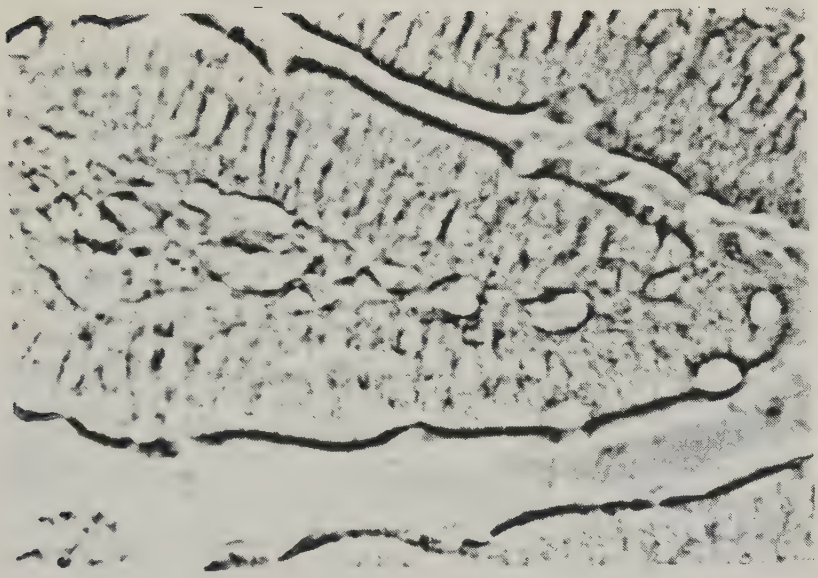


Abb. 14: Magen (Ratte), Fixierung nach CARNOY

Mit Ausnahme des sehr dunkel erscheinenden Bürstensaums wirkt diese mikrophotographische Aufnahme im Phasenkontrast etwas "verwaschen" und weitgehend kontrastarm.

Abb. 15: Gleiches Präparat wie in Abb. 14, jedoch zusätzlich 20 min mit 5 Gewichts-%iger PWS behandelt

Nach der Einwirkung von 5 %iger PWS zeigt sich hier dasselbe Präparat gegenüber der Abb. 14 deutlich verändert. In dem zuvor kräftiger schwarz dargestellten Bürstensaum ist jetzt dessen Strukturierung partiell deutlicher zu erkennen, an anderen Stellen stört der sehr ausgeprägte "Halo". Ein Teil der Objektstrukturen ist deutlicher, ein anderer undeutlicher als vor der Behandlung mit PWS abgebildet, und bei manchen Objektanteilen entsteht auch der Eindruck von Strukturveränderungen. Nahezu alle Objektstrukturen weisen gegenüber dem Phasenkontrastbild vor der Behandlung mit PWS einen erheblich intensiveren Bildkontrast auf.



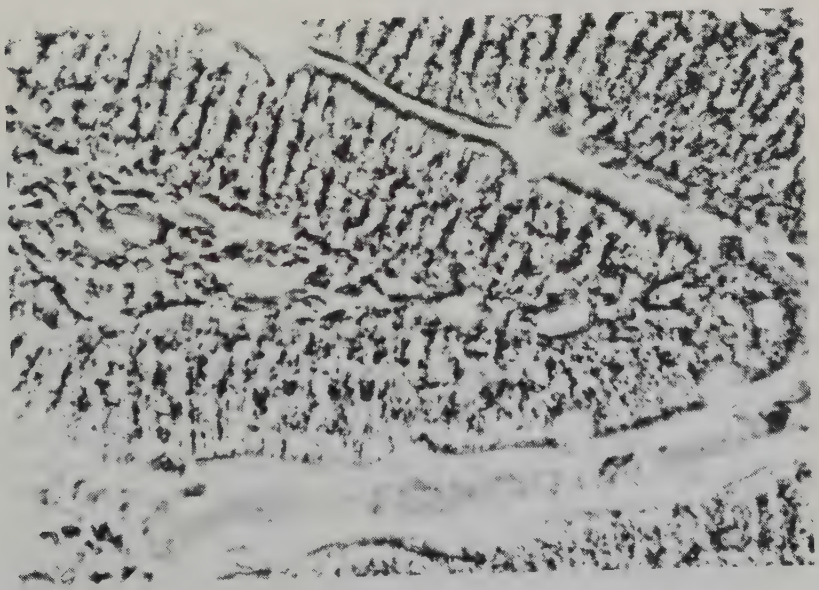


Abb. 16: Quergestreifter Muskel, Formol-fixiert

Man erkennt besonders im oberen Drittel des Photos feine Kollagenfaserbündel, die kontrastarm dargestellt sind. Andere Kollagenstrukturen, besonders in der Bildmitte, erscheinen ebenso wie die Muskelfasern kontrastreicher.

Abb. 17: Gleiches Präparat wie Abb. 16, jedoch 20 min mit 5 Gew.-%iger PWS behandelt

Bei diesem Objekt kann man die kontraststeigernde Wirkung der PWS an den feineren Kollagenstrukturen besonders deutlich erkennen. Die meisten Strukturen im oberen Drittel des Photos erfuhren durch die Behandlung mit PWS eine derartige Brechzahlerhöhung, daß der Gangunterschied zwischen Objektstrukturen und Einbettungsmittel in einen Bereich eines erhöhten Bildkontrastes fiel. Bei den zuvor schon kontrastreich abgebildeten Strukturen in der Bildmitte ist teilweise der Übergang zu negativem Bildkontrast zu sehen.

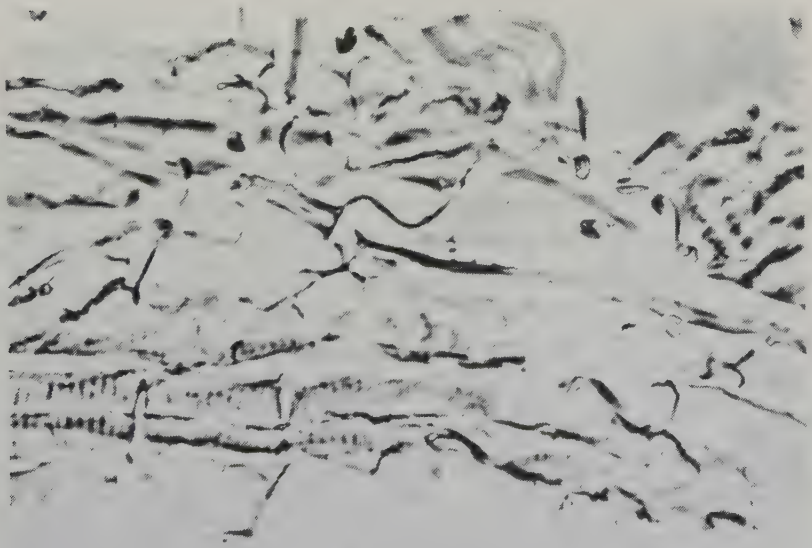


Abb. 18: Leber (Ratte), Äthanol-fixiert

Diese mikrophotographische Aufnahme zeigt vorzugsweise kontrastreich dargestellte, dickere Strukturen neben feineren, kontrastarm abgebildeten. Nur ganz vereinzelt ist im Zentrum einer Struktur ein Übergang von positivem zu negativem Bildkontrast zu finden.

Abb. 19: Dasselbe wie Abb. 18, zusätzlich 20 min Behandlung mit 5 Gew.-%iger PWS

Durch die Einwirkung der PWS ist ein kontrastreicheres und dadurch schärfer wirkendes Bild entstanden. Selbst feinste Struktureinzelheiten sind deutlich zu erkennen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß ein helles Strukturbild mit einem scharfen, dunklen Rand entweder einen quergeschnittenen Hohlkörper oder eine dickere, massive Objektstruktur darstellen kann.

# H. DISKUSSION

Die Beobachtungen früherer Autoren (z. B. v. MÖLLENDORF 22, PETERSEN 27 und WURMBACH 46), daß nämlich die Lichtbrechungszahl bestimmter Strukturen histologischer Präparate bei Behandlung mit PWS bzw. PMS ansteigt, konnten durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt und quantifiziert werden.

## H. 1. BINDUNG DER PWS BZW. PMS

Von MÖLLENDORF (22) erklärte die differenzierende Wirkung der PWS bzw. PMS lediglich mit der physikalischen Verteilung der beiden Säuren im mikroskopischen Schnitt, ohne daß eine spezifische Wirkung der PWS bzw. PMS auf bestimmte Strukturen anzunehmen sei. Eine Grundlage für diese Vermutung würde die Beobachtung ergeben, daß PWS und PMS in Gelatine sehr viel langsamer diffundiere als Essigsäure und Salzsäure. Daraus resultiere die Annahme, daß PWS und PMS in alle lockeren Strukturen des Präparates trotz Anwesenheit von Eosinmolekülen hineindringe und auf das Eosin zunächst an diesen Orten intensiv einwirke, da PWS bzw. PMS als relativ grob disperse Substanzen hier stark adsorbiert und somit konzentriert werden. Die Wirkungsweise wurde prinzipiell mit derjenigen der schwer diffusiblen sauren Farbstoffe verglichen.

Die Grundeinheiten des Kollagens bestehen aus 3 zusammengewundenen Polypeptidspiralen, wobei die Seitenketten der Aminosäuren nach außen ragen. Der genaue Aufbau dieser sogenannten Tripelhelix ist für die vorliegende Untersuchung ohne Bedeutung.

Untersuchungen von KÜHN und Mitarbeiter (18) ergaben die Annahme einer chemisch-physikalischen Bindung zwischen Kollagenfibrillen und PWS. Die Grundeinheiten des Kollagens seien hexagonal angeordnet, ihr Abstand könne nach röntgenographischen Untersuchungen je nach dem Quellungszustand zwischen 1 und 1,6 nm schwanken. Der Zusammenhalt in den dunkel gefärbten Teilen der Querstreifung in den Fasern geschehe offenbar über die entgegengesetzt geladenen Gruppen der Seitenketten. Das annähernd kugelförmige, dreibasische PWS-Ion passe mit seinem Durchmesser von 1 nm gut in die Zwischenräume der Peptidspiralen (Einschlußverbindung). Es binde 3 Guanidogruppen aus 3 benachbarten Polypeptidspiralen. Dadurch fixiere es diese ungefähr in einer Ebene und bringe sie in "Register", d. h., die Anhäufung der schweren und polaren Aminosäuren würden genauer nebeneinander zu liegen kommen und könnten sich nicht mehr so leicht verschieben.

Eine solche Einschlußverbindung, wie sie gerade beschrieben worden ist, kann - ohne daß eine zusätzliche echte chemische Bindung vorhanden ist - dann recht stabil sein, wenn Größe und Gestalt des Hohlraumes im Molekül (hier in Form einer Tripelhelix) gerade den Dimensionen des PWS- bzw. PMS-Ions entsprechen.

SILVERMAN et al. (38) beobachteten, daß sich PWS in Muskelfasern einlagert.

GLICK et al. (10) erklärten die durch die PWS bedingte Fällung des Gewebes als eine einfache Ioneninteraktion zwischen den positiv geladenen Polysacchariden und den negativ geladenen Phosphorwolframteilchen.

Die Arbeiten von QUINTARELLI et al. (28 und 29) wiesen darauf hin, daß bei höherer PWS-Konzentration und bei tiefem pH-Wert alle Proteine, Aminosäuren, Glykogen, neutrale Zucker und Mucopolysaccharide gefällt werden. Da die Reaktion abhängig vom pH-Wert sei, würde es naheliegen, daß die Bindungen im wesentlichen auf Ionenwechselwirkungen zurückzuführen seien.

## H. 2. KRITISCHE ERÖRTERUNG DER EIGENEN BEFUNDE

### H. 2.1. Einflüsse physikalischer Eigenschaften der PWS bzw. PMS

Nach den Ergebnissen von KÜHN und Mitarbeitern(18) können bis zu 890 mg PWS/g Kollagen aufgenommen werden, was einem PWS-Gehalt des Kollagens von etwa 47 Gew.-% entspricht. Dieses Ergebnis und das hohe Molekulargewicht der beiden Säuren legten nahe, daß die eigene Lichtbrechungszahl von PWS bzw. PMS die Brechzahl des Präparates entscheidend beeinflussen könnte. Deshalb wurde zunächst die Brechzahl der wässrigen Lösungen dieser beiden Substanzen gemessen. Die Ergebnisse (Abbildung 3) erreichten jedoch nicht die Brechzahlwerte, die an behandelten, wasserfreien Präparaten ermittelt wurden. Da es sich aber, wie oben beschrieben, nicht nur um eine physikalische Anlagerung der PWS bzw. PMS an die Struktur des Präparates handelt, sondern sehr wahrscheinlich um eine Einschlußverbindung mit zusätzlichen chemischen Bindungen, vergrößert sich das Molekulargewicht und die Dichte der Substanz durch die sich einlagernde PWS- bzw. PMS-Masse beträchtlich. Man darf daher eine Brechzahl erwarten, die über derjenigen der PWS- bzw. PMS-Lösung sowie über derjenigen der unbehandelten Präparatstruktur liegt.

Die unter "Fragestellung" erwähnten Phänomene bei PWS- bzw. PMS-behandelten Präparaten konnten mit den Werten der Absorptionsspektren (Abbildung 5) nicht erklärt werden. Obwohl bei der 50 Gew.-%igen PWS die Transmission über das gesamte gemessene Spektrum nicht über 50 % reichte, kann damit keinesfalls eine nennenswerte Kontraständerung des mikroskopischen Bildes durch Lichtabsorption gedeutet werden. Rechnet man nämlich die Ergebnisse , die auf 20 mm Schichtdicke bezogen sind, auf mikroskopische Verhältnisse (ca. 10 µm) um, so erhält man verschwindend kleine, durch die PWS bzw. PMS verursachte Änderungen der Absorptionswerte für das sicht-

bare Licht. Die in der histologischen Färbetechnik üblichen Farbstoffe besitzen eine ungleich höhere Lichtabsorption als PWS oder PMS.

Die Dispersion (Abb. 4) für 50 Gew.-%ige PWS bzw. PMS fiel mit 37,9 bzw. 28,7 relativ hoch aus. Trotzdem lassen sich damit die der Fragestellung dieser Arbeit zugrunde liegenden, unter Abschnitt C. beschriebenen Erscheinungen an mit PWS bzw. PMS behandelten histologischen Präparaten nicht erklären.

### H. 2.2. Änderung des Gangunterschiedes

Um die Auswirkung der Änderung der optischen Dichte durch die PWS-Behandlung zu verdeutlichen, wurden die Extremwerte der Ergebnisse aus Abbildung 6 in ein Schaubild (Abb. 20) eingetragen.

Erklärung zu Abbildung 20:

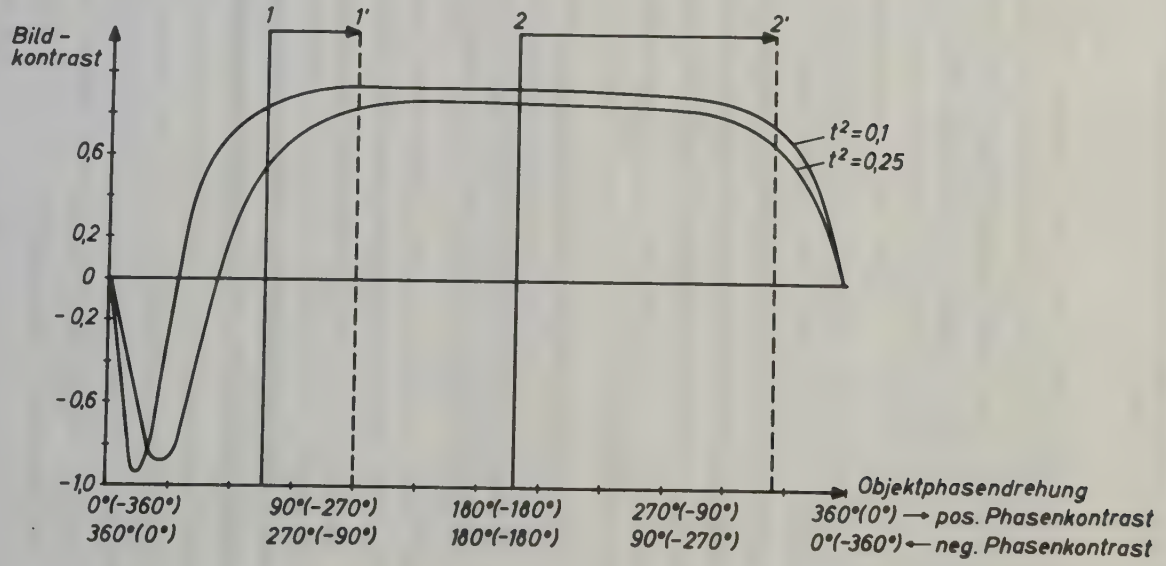
$t^2$: relative Durchlässigkeit von Phasenplättchen

1 und 1': kleinster gemessener Gangunterschied vor und nach der Behandlung mit PWS gegenüber dem Einbettungsmittel

2 und 2': größter gemessener Gangunterschied vor und nach der Behandlung mit PWS gegenüber dem Einbettungsmittel

Die Kontrastfunktion für Mischobjekte verläuft, gleiche Bedingungen vorausgesetzt, insgesamt flacher als diejenige für reine Phasenobjekte.

Abb. 20: Kontrastfunktion für reine Phasenobjekte im strengen Phasenkontrast (relative Phasendrehung des Phasenringes im Phasenplättchen ± 90°) in Abhängigkeit von der Objektphasendrehung (geringfügig verändert nach BEYER 3)



Wie aus Abbildung 20 zu entnehmen ist, bewegt sich die Änderung des Gangunterschiedes durch die PWS hier bei Verwendung des Einbettungsmittels W 15 und der angegebenen Phasenkontrasteinrichtung gerade noch im Bereich des Maximums des Bildkontrastes. Bei geringeren Dicken der Präparatstruktur (1 bzw. 1' in Abb. 20) erreicht man durch die Behandlung mit PWS bzw. PMS eine Kontraststeigerung, bei dickeren Strukturen (2 bzw. 2' in Abb. 20) vermindert sich im phasenkontrastmikroskopischen Bild bereits wieder der Kontrast. Selbst ein Umschlagen von positivem zu negativem Phasenkontrast kann durch eine Behandlung mit PWS bzw. PMS leicht eintreten.

Es kann also bei den in der Praxis vorkommenden Phasen- und Mischpräparaten vorkommen, daß eine Behandlung mit PWS bzw. PMS sowohl zur Steigerung als auch zur Minderung des Bildkontrastes bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtungsweise führt, je nach:

a. Art und Weise der Behandlung mit PWS bzw. PMS,
b. der Brechzahl des Einbettungsmittels,
c. der Dicke und Beschaffenheit der Präparatstruktur
d. und der Art der verwandten phasenkontrastmikroskopischen Einrichtung.

Die einfachste Methode zur Optimierung des Bildkontrasts im Phasenkontrastmikroskop besteht darin, die Brechzahl des Einbettungsmittels im Verhältnis zu der des Präparates so abzustimmen, daß das Produkt dieser Brechzahldifferenz und der Dicke des Objektes und damit die resultierende Phasendifferenz in den für einen optimalen Bildkontrast erforderlichen Bereich fällt.

Mit dem in dieser Versuchsreihe angewandten Verfahren konnte nicht ermittelt werden, ob die Erhöhung des Gangunterschiedes durch Änderung der Brechzahl oder der Dicke des Präparates hervorgerufen wurde. Setzt man voraus, daß es sich bei der Einlagerung der PWS bzw. PMS im Gewebe um Einschlußverbindungen handelt, kann man

vermuten, daß die Dicke der Präparatestrukturen trotz PWS- bzw. PMS-Behandlung weitgehend konstant bleibt. Die Änderung der optischen Dichte könnte man so vor allem einer Brechzahlerhöhung zuordnen.

Obwohl sich Erythrozyten und kollagene Bindegewebsfasern bezüglich ihrer Basizität ähnlich sind, konnte in den vorliegenden Untersuchungen keine Erhöhung des Gangunterschiedes bei Erythrozyten durch eine Behandlung mit PWS gefunden werden, wie dies bei dem gallertigen Bindegewebe der Fall war.

SEKI (37) begründete dies mit dem Unterschied der Dichtigkeiten der beiden Gewebselemente: Die Erythrozyten gehörten zu den trockensten Gebilden im menschlichen Körper. Ihre äußere Begrenzungsschicht sei überdies besonders engporig gebaut. Im Gegensatz dazu seien die kollagenen Fasern außerordentlich locker und weitporig. Aufgrund dieses Dichtigkeitsunterschiedes sei mit gewissen Farbstoffen eine kontrastreiche, differente Darstellung der beiden Gewebselemente möglich. Die PMS, die durch eine Hydratationshülle um ihr Anion noch in weitem Maße das Ionenvolumen vergrößert haben müsse, dringe überhaupt nicht oder nur ganz wenig in die Erythrozyten ein, während sich am meisten PMS an den kollagenen Fasern anreichere.

### H. 2.3. Änderung der Brechzahl

Die bei den Messungen der Brechzahl der STOESS-Gelatine festgestellten Grenzlinien im ABBE-Refraktometer wurden als HERSCHEL'sche Streifen gedeutet, eine besondere Form der Interferenzen an dünnen Blättchen (persönliche Mitteilung von Dipl.-Phys. J. RIENITZ, Inst. f. Wiss. Mikroskopie, Tübingen): Befindet sich ein derartiges Blättchen innerhalb eines optisch dichteren Mediums und wird es von Lichtstrahlen unter einem wenig kleineren Einfallswinkel als dem Grenzwinkel der Totalreflexion getroffen, so treten diese Streifen auf.

Sie kommen sowohl im auffallenden als auch im durchfallenden Licht vor. Man kann diese HERSCHEL'schen Streifen z. B. an einer von 2 Glasprismen eingeschlossenen Luftschicht beobachten. Im Gegensatz zu den beiden ersten Streifen konnte bei den HERSCHEL'schen Streifen keine Polarisationsabhängigkeit festgestellt werden. Es war nicht möglich, diesen ersten und zweiten Grenzstreifen im ABBE-Refraktometer bei der Messung der Brechzahl der STOESS-Gelatine zu erklären. Fast ausgeschlossen ist, daß die auf Objektträger aufgegossene Gelatine eine Vorzugsfaserrichtung aufwies.

Die Gelatine war nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS spröder und härter als zuvor. Wahrscheinlich beruht diese Änderung der Eigenschaft, sowie das Phänomen, daß die Gelatine beim Lufttrocknen stark unter Spannung stand, darauf, daß die PWS 3 Guanidogruppen aus 3 benachbarten Polypeptidspiralen bindet und diese dabei annähernd in einer Ebene fixiert. Somit könnten vor der PWS- bzw. PMS-Behandlung ungeordnet in Schlangenform vorliegende Polypeptidspiralen zu einer gestreckteren Struktur gezwungen werden und infolge der PWS- bzw. PMS-Einlagerung hart und spröde werden.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen für 1, 2 und 5 Gew.-%ige PWS bzw. PMS ähnliche Charakteristika bezüglich der PWS- bzw. PMS-Aufnahme der Gelatine. Präparate, die weniger als 16 min mit PWS bzw. PMS behandelt wurden, waren aufgrund ihrer Dicke von 30 µm noch nicht homogen mit einer der beiden Säuren durchsetzt. Die Brechzahl der Gelatine war dadurch im ABBE-Refraktometer nicht meßbar. Nur die 5 Gew.-%ige PWS erzielte nach 8 min Einwirkdauer eine meßbare Brechzahlerhöhung von etwa 0,042 gegenüber dem Kontrollobjekt. Die übrigen verwendeten Säurelösungen bewirkten diesbezüglich weitaus weniger. In der Anfangsphase (16 min bis 1 h Einwirkdauer) stieg die Brechzahl kaum an. Danach erhöhte sie sich bis zu einer 8-stündigen Behandlungsdauer stark und lief daraufhin asymptotisch einem oberen Grenzwert entgegen. Allgemein verur-

sachte die höher konzentrierte Säure auch eine höhere Brechzahl der Gelatine. Die PMS erzielte eine geringere Lichtbrechungszahl als die PWS.

Setzt man voraus, daß die Brechzahlerhöhung in Abhängigkeit von der PWS- bzw. PMS-Aufnahme steht, so bringt ein Vergleich der Ergebnisse mit denen von KÜHN und Mitarb. (18) weiteren Informationswert. Sie stellten die Masse der PWS, die von Kollagenfibrillen aufgenommen wurde, fest: Nach 24-stündiger Behandlung mit 2 %iger PWS und kurzem, zweimaligem Auswaschen in aqua dest. habe sich in 1 Gramm nativem Kollagen 530 - 560 mg PWS eingelagert. Bei einer vergleichbaren Behandlung wurde in der vorliegenden Arbeit eine Brechzahl von etwa 1,60 gemessen. Die PWS-Aufnahme ließe sich, so KÜHN und Mitarb., durch Auflockern (Quellen bzw. mehrmaliges Behandeln mit PWS mit anschließender Wässerung) des Fibrillengefüges weitgehend erhöhen. Am höchsten (850 - 890 mg PWS/g Kollagen) solle die Aufnahme bei besonders gründlich gereinigtem Reinkollagen sein (Behandlung mit Trypsin, schütteln mit Kalkwasser, waschen mit verdünnter Essigsäure).

Die Brechzahl der luftgetrockneten Gelatine (Tab. 5) lag nach der PWS- bzw. PMS-Behandlung bei vorheriger Formolfixierung niedriger als ohne Fixierung, während die Brechzahl der Kontrollwerte unabhängig von der Fixierung gleich blieben. Diese Resultate sind mit denen von SILVERMAN et al. (38) zu vergleichen. Sie stellten bei Kollagen von Ochsen und Skeletmuskeln von Ratten nach Glutaraldehydfixierung eine signifikant verminderte PWS-Aufnahme gegenüber demselben Gewebe ohne Fixierung fest. Dieser Einfluß der Fixierung auf die PWS- bzw. PMS-Aufnahme kann so erklärt werden, daß das Formol durch Vernetzung des Gewebes den beiden hochmolekularen Säuren Bindungsmöglichkeiten nimmt oder die Gewebsgrundstrukturen schrumpfen läßt und somit weniger Einschlußverbindungen des Gewebes mit PWS bzw. PMS zuläßt. Formol kann so das Gegenteil einer Quellung bewirken.

Ein Vergleich verschiedener Fixierungen bei entwässerter Gelatine (Tab. 6) brachte unterschiedliche Ergebnisse. Die Brechzahlen der unbehandelten Präparate stiegen von Formol- über Bouin- zu Susafixierung an. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich wird, ändert sich die Brechzahl der unbehandelten Gelatinepräparate durch eine Formolfixierung nicht. Alle weiteren Ergebnisse aus Tabelle 5 sind nicht mit denen der Tabelle 6 vergleichbar, da beide Meßreihen sich in wesentlichen Punkten wie Dicke der Präparate, Behandlungsart, Trocknung der Objekte und Meßbedingungen unterscheiden. Das Susagemisch enthält Quecksilberchlorid, das wahrscheinlich für die hohen Ausgangswerte der Brechzahl bei Präparaten ohne Behandlung mit PWS bzw. PMS verantwortlich war. Die PWS-Behandlung verursachte unabhängig von der Art der Fixierung eine beinahe gleichmäßige Erhöhung der Brechzahlen der Präparate. Die PMS rief besonders nach Formol- und Bouinfixierung beträchtlich höhere Brechzahlverschiebungen als die PWS hervor. Diese höhere PMS-Aufnahme im Gegensatz zu den Ergebnissen ohne Fixierung (Abb. 7 und 8) bestätigt die oben genannte Vermutung, daß die Fixierung die Präparatstrukturen dergestalt schrumpfen läßt, daß die niedermolekularere PMS (Molekulargewicht = 1825) gegenüber der PWS (Molekulargewicht = 2880) bei der Einlagerung ins Gewebe im Vorteil ist. Offensichtlich ist für diese Einschlußverbindung eine optimale Dimension des Hohlraumes, in den die PWS bzw. PMS eingelagert wird, von großer Bedeutung.

Dies scheint ebenso für die Muskel- und Kollagenfasern (Tab. 7 und 8) zuzutreffen: Auch hier erreichten die PMS-Präparate eine höhere Brechzahl als die vergleichbaren, mit PWS behandelten Schnitte. Der Unterschied der Brechzahl zwischen 1 und 5 Gew.-%iger Säure betrug ungefähr 0,001. Die Muskelfasern wiesen nach der Behandlung mit PMS eine höhere, mit PWS eine niedrigere Brechzahl als die Kollagenfasern auf. SILVERMAN et al. (38) untermauerten diese Ergebnisse: Bestimmungen der aufgenommenen prozentualen PWS-Menge ergaben für fixiertes Kollagen 50 Gew.-%, für fixierte Skeletmuskeln von Ratten 37 Gew.-%.

## H. 2.4. Auswaschbarkeit der PWS

Die Auswaschung der PWS (Abb. 10) durch aqua dest. war nur sehr langsam möglich. In der histologischen Technik (Tab. 3) werden die Präparate meist nur kurz abgespült, höchstens 1 h gewässert. Nach 1-stündiger Wässerung wurden aber immer noch hohe Brechzahlen der behandelten Präparate gemessen. Die Brechzahlerhöhung (= 100 %) durch die PWS-Einwirkung verringerte sich innerhalb der ersten Stunde Wässerung nur um ca. 5 %, nach 5 Tagen um etwa 40 %. Nach KÜHN und Mitarb. (18) erreicht der PWS-Gehalt im Kollagen erst nach 10 - 12 Tagen Wässerung einen Endwert zwischen 400 und 500 mg PWS/g Kollagen.

Zahlreiche andere Autoren (z. B. QUINTARELLI et al. 29, SCOTT 36, SILVERMAN et al. 38) wiesen auf die Beeinflußbarkeit der PWS-Ausschwemmung aus dem Gewebe durch den pH-Wert der Auswaschlösung hin. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt (Abb. 9), daß nach 1-stündiger Einwirkung einer Auswaschlösung von pH 7 die Brechzahlerhöhung (= 100 %) durch PWS um 19 % gesunken war. Dies bedeutet, daß bei pH-Wert 7 einer Auswaschlösung signifikant größere Mengen PWS ausgewaschen werden können als unter sonst gleichen Bedingungen in aqua dest. (pH-Wert nach dem Auswaschen von 2 Präparaten in 60 $cm^3$ aqua dest.: 4,5 - 5). Bei einem pH-Wert von 7 soll die PWS gänzlich aus dem betreffenden Gewebe entfernt werden können (KÜHN und Mitarb. 18, SILVERMAN et al. 38).

## H. 3. SCHLUSSFOLGERUNG

Die in dem Abschnitt "Fragestellung" beschriebenen Phänomene konnten durch die Erhöhung der Brechzahl einiger Gewebsstrukturen durch die PWS- bzw. PMS-Behandlung erklärt werden: Sowohl die erwünschten (Steigerung des Bildkontrastes feiner Objektstrukturen bei der Be-

trachtung im Phasenkontrast) als auch die negativen Auswirkungen (Wandlung von positivem zu negativem Bildkontrast, Minderung des Bildkontrastes, störende Becke-Linie bzw. "Halo" und Farbverschiebungen) der Behandlung der Präparate mit PWS bzw. PMS wurden beobachtet.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß weder ein Phasen- noch ein Absorptionsobjekt nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS als solches optimal geeignet ist. So waren entweder die Brechzahlen der behandelten Präparatstrukturen gegenüber dem Einbettungsmedium zu hoch oder die Brechzahldifferenz von Objektträger, Deckglas, Einbettungsmittel und behandelter Objektstruktur war zu groß (siehe unter "Voraussetzungen").

Das hier z. B. bei den Muskelschnitten benutzte Einbettungsmittel W 15 besaß eine Brechzahl von $n_D = 1,515$, die mit PWS bzw. PMS behandelten Muskel- und Kollagenfasern kamen auf durchschnittlich 1,59. Nach DIN 58884 (7) muß ein Objektträgerglas eine Brechzahl von $n_E = 1,52$ und ein Deckglas von $n_E = 1,524$ aufweisen. Derart hohe Brechzahldifferenzen, die hieraus resultieren, vermögen bei Hellfeldbetrachtung als störende Becke-Linien zu imponieren oder gar zu Farbverschiebungen führen.

Bezieht man hingegen die Dicke der Präparatstrukturen mit in die Überlegung ein und nimmt man an, daß die Dicke durch die PWS bzw. PMS annähernd unbeeinflußt bleibt, so erhält man für phasenkontrastmikroskopische Betrachtungsweise zweierlei Ergebnisse: Feine Objektstrukturen mit mangelndem Bildkontrast fallen infolge eines geringen Gangunterschiedes gegenüber dem Einbettungsmedium durch die höhere Brechzahl nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS in einen Bereich des Gangunterschiedes, der einen optimalen Bildkontrast bewirkt. Gröbere Objektstrukturen hingegen, die vor allem durch

den Faktor "Dicke" bereits vor der Behandlung mit PWS bzw. PMS im Bereich des optimalen positiven Bildkontrastes liegen, haben nach der PWS- bzw. PMS-Einwirkung häufig den ersten Nulldurchgang der Bildkontrastfunktion (Abb. 20) durchlaufen und erscheinen dadurch im negativen oder im verminderten positiven Bildkontrast. Rechnerisch lag der Gangunterschied der Muskelschnitte gegenüber dem Einbettungsmittel in der Größenordnung einer Wellenlänge. Dies reicht bereits aus, um den Bildkontrast wechseln zu lassen.

Wenn man in der histologischen Technik auf die erwünschten Auswirkungen einer Behandlung mit PWS bzw. PMS nicht verzichten will, die negativen Folgen jedoch möglichst gering halten möchte, so empfiehlt sich für Absorptionsobjekte folgendes:

a. Die PWS ist der PMS vorzuziehen, da die Brechzahlerhöhung unter der Behandlung mit PWS geringer ausfällt als mit PMS.

b. Die Präparate sind ohne Quellung der Strukturen durch unnötige oder zu lange Vorbehandlung einer möglichst kurzen PWS-Behandlung zuzuführen.

c. Von Schwermetallfixierungen in der Kombination mit PWS bzw. PMS in den weiteren Behandlungsschritten ist abzusehen.

Eine allgemeine Empfehlung für die phasenkontrastmikroskopische Beobachtung von mit PWS bzw. PMS behandelten Präparaten kann nicht gegeben werden, da der Bildkontrast wesentlich von dem Gangunterschied der interessierenden Objektstruktur gegenüber dem Einbettungsmittel abhängt. So kann es von Vorteil sein, das die Bildqualität nicht sehr beeinträchtigende "Streulicht", das durch eine große Brechzahldifferenz von Objektstruktur und Einbettungsmittel hervorgerufen wird, zugunsten eines optimalen Bildkontrastes interessierender Strukturfeinheiten hinzunehmen. Je nachdem also, welche Strukturen des Ver-

zögerungspräparates im Phasenkontrastmikroskop betrachtet werden sollen, gilt zusätzlich zu den oben unter a. bis c. für das durchfallende Hellfeld beschriebenen Empfehlungen folgendes:

d. Der Gangunterschied zwischen interessierenden Objektstrukturen und Einbettungsmedium soll durch Variation der Brechzahl des Einbettungsmittels so gewählt werden, daß die zu betrachtenden Strukturen im optimalen Bildkontrast erscheinen.

e. Eine weitere, aber nur bedingt praktikable Möglichkeit, das phasenkontrastmikroskopische Bild nach Behandlung mit PWS bzw. PMS zu beeinflussen, besteht darin, den Lichtschwächungsfaktor des Phasenplättchens zu ändern. Liegen alle im Präparat auftretenden Phasendifferenzen unter 30 Grad, sollte das $90^{\circ}$-Plättchen etwa 75 - 90 % des direkten Lichtes absorbieren, während von 30 - 90 Grad ein nicht absorbierendes Plättchen am vorteilhaftesten sei (FRANÇON 9). Für alle Objektphasendrehungen von 60 - 300 Grad sei die Schwächung des gebeugten Lichtes günstiger (BEYER 3).

# I. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der PWS bzw. PMS auf die Brechzahl histologischer Objekte festgestellt und quantifiziert. Hierzu wurden die Dispersion, die Absorption und die Brechzahlen verschieden konzentrierter PWS bzw. PMS gemessen, die Änderung der optischen Dichte durch eine PWS-Behandlung an gallertigem Bindegewebe der Nabelschnur und an Erythrozyten bestimmt, sowie die Brechzahl von Gelatine, Kollagen und quergestreifter Muskulatur vor und nach verschiedenen Behandlungsarten mit PWS bzw. PMS gemessen. Dabei wurde die Einwirkdauer der PWS bzw. PMS, die Fixierungsart der Gewebe, der pH-Wert der Auswaschlösungen und die Dauer der Auswaschung der PWS bzw. PMS variiert.

Die Brechzahlen wurden vor allem an Gelatine als Modell für Kollagen und an Muskelschnitten ermittelt. Die Messung der Lichtbrechungszahl vor und nach der Behandlung mit PWS bzw. PMS erfolgte im ABBE-Refraktometer und verschiedenen Anwendungen der Immersionsmethode. Dabei wurde eine Erhöhung der Brechzahl und des Gangunterschiedes durch die Behandlung mit PWS bzw. PMS festgestellt und die Erwartungen somit bestätigt. Sowohl bei Muskel- als auch bei Kollagenfasern wurden je nach Behandlungsart, die der histologischen Technik angepaßt war, infolge PWS- bzw. PMS-Einlagerungen Brechzahlerhöhungen zwischen 0,034 und 0,070 gemessen, wobei die PMS höhere Brechzahlen als die PWS bewirkte.

Im einzelnen bestimmten folgende Faktoren das Ausmaß der Brechzahlerhöhung durch die PWS bzw. PMS:

a. Art des Gewebes
b. Vorbehandlung (Schnittdicke, Quellung, Entwässerung)
c. Art der Fixierung des Präparates
d. Konzentration der PWS bzw. PMS
e. Einwirkdauer der PWS bzw. PMS
f. pH-Wert der Auswaschlösung
g. Auswaschdauer

Es wurde festgestellt, daß sowohl die im durchfallenden Hellfeld (störende Becke-Linie und Farbverschiebungen bei schwachen Vergrößerungen) als auch die im Phasenkontrastmikroskop beobachteten Erscheinungen (Wandlung von positivem zu negativem Bildkontrast, einerseits verbesserter, andererseits verschlechterter Bildkontrast in Abhängigkeit vom Gangunterschied der Objektstruktur gegenüber dem Einbettungsmittel und breiter "Halo") an histologischen Objekten auf eine Brechzahlerhöhung durch die Einlagerung der PWS bzw. PMS zurückzuführen sind, was mit mikrophotographischen Aufnahmen belegt wurde.

Durch die Erhöhung der Brechzahl vieler Objektstrukturen durch die PWS bzw. PMS war eine Grundbedingung des Phasenkontrastverfahrens, nämlich daß der Gangunterschied des Präparates gegenüber dem Einbettungsmedium in Relation zur Wellenlänge des benutzten Lichtes klein sein soll, nur noch bei feinen Objektstrukturen (von kleinen Dimensionen senkrecht zur Objektebene) erfüllt, welche daher kontrastreicher als vor der Behandlung mit PWS bzw. PMS erschienen. Dickere Gewebestrukturen erfuhren durch die Behandlung mit PWS bzw. PMS eine derartige Steigerung des Gangunterschiedes gegenüber dem Einbettungsmittel, daß sie aus dem Bereich des optimalen Bildkontrastes fielen und oft sogar bei Phasenverschiebungen von nahezu einer Wellenlänge im negativen Bildkontrast imponierten.

Auch für Absorptionsobjekte gelten prinzipiell die gleichen Bedingungen für das Brechzahlverhalten und seiner Auswirkung. Dabei muß allerdings bei der Anwendung des Phasenkontrastverfahrens auf gefärbte Objekte die Wellenlängenabhängigkeit des Phasenkontrasteffektes berücksichtigt werden, die bei Farbstoffen mit ausgeprägten Transmissionsmaxima zu Farbumschlägen im Phasenkontrast führen kann.

Auch bei der Hellfelduntersuchung im durchfallenden Licht an gefärbten histologischen Präparaten treten unter dem Einfluß von PWS bzw. PMS Änderungen der Brechzahl der Objektstrukturen und damit u. U. so große Differenzen zwischen der Brechzahl von Objektträger, Deckglas und Einbettungsmedium einerseits und Objektstruktur andererseits auf, daß die von einem idealen gefärbten mikroskopischen Präparat zu fordernde Eigenschaft eines möglichst ausschließlichen Amplitudenobjektes nicht mehr erfüllt ist.

## K. LITERATURVERZEICHNIS


1. BARER, R.: Phase Contrast Microscopy. Research 8, 341-350 (1955)

2. BECHER, S.: Über Anisol als Immersionsmittel und über andere leicht entfernbare und restlos verdunstende Immersionsflüssigkeiten. Z. wiss. Mikr. 42, 16-31 (1925)

3. BEYER, H.: Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens. Frankfurt a. M. 1965

4. BURRI, C.: Das Polarisationsmikroskop. Basel 1950

5. CASON, J. E.: A rapid one-step Mallory-Heidenhain Stain for connective tissue. Stain Techn. 25, 225-226 (1950)

6. CROSSMON, G.: A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. Anat. Rec. 69, 33-38 (1937) Philadelphia

7. DIN 58884: Objektträger, Deckgläser, Immersionsmittel für Mikroskopie. DIN 58884, Beuth-Vertrieb GmbH Berlin 30 und Köln (1968)

8. DOMAGK, G.: Neuerungen auf dem Gebiet der histologischen Technik. Medizin und Chemie 1, 126-136 (1933)

9. FRANÇON, M.: Einführung in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie. Karlsruhe: Braun 1967

10. GLICK, D. and J. E. SCOTT: The invalidity of "phosphotungstic acid as a specific electron stain for complex carbohydrates". J. Histochem. Cytochem. 19, 63-64 (1971)

11. GOLDNER, J.: A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. Amer. J. Path. 14, 237-243 (1938)

12. HASELMANN, H.: Beiträge zur Phasenkontrast-Mikroskopie. 2. Mitteilung: Strukturprobleme im Lichte der Phasenkontrast-Mikroskopie. Mikroskopie 6, 9-14 (1951)

13. HASELMANN, H.: 20 Jahre Phasenkontrast-Mikroskopie. Z. wiss. Mikr. u. mikr. Technik 63, 140-155 (1957)

14. HEIDENHAIN, M.: Über die Mallorysche Bindegewebsfärbung mit Karmin und Azokarmin als Vorfarben. Z. wiss. Mikr. 32, 361-372 (1915)

15. HIRSCH, Th. v.: Phasenkontrastmikroskopie histologischer Schnitte. Z. wiss. Mikr. 61, 337-350 (1952/53)

16. HOPP, V.: Gelatine, ihre molekulare Struktur, Herstellung und Anwendungsgebiete. Chem. Zeitung 89, 469-473 (1965)

17. HUETER, C.: Zur Technik der Bindegewebsfärbung. Zbl. Path. 22, 389-392 (1911)

18. KÜHN, K., W. GRASSMANN und U. HOFMANN: Die elektronenmikroskopische "Anfärbung" des Kollagens und die Ausbildung einer hochunterteilten Querstreifung. Z. Naturforschg. 13 b, 154-158 (1958)

19. MALLORY, F. B.: Phospho-molybdic Acid Haematoxylin. Anat. An. 6, 375-376 (1891)

20. MALLORY, F. B.: On certain improvements in histological technique. J. exp. Med. 2, 529-533 (1897)

21. MASSON, P.: Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. J. Tech. Methods 12, 75-90 (1929)

22. MÖLLENDORF, W. v.:
Untersuchungen zur Theorie zur Färbung fixierter Präparate.
Ergebn. Anat. u. Entw.-gesch.
25, 15-22 (1924)

23. MÜLLER, R.: Zur Verbesserung der Phasenkontrast-Mikroskopie durch Verwendung von Medien optimaler Brechungsindices.
Mikroskopie 11, 36-46 (1956)

24. OETTLÉ, A. G.: "Optical membranes": A common artefact.
J. Roy. Micr. Soc. 70, 255-265 (1950)

25. PAPANICOLAOU, G. N.:
A new procedure for staining vaginal smears.
Science 95, 438-439 (1942) Washington

26. PASINI, A.: Über eine neue und einfache Methode zur Demonstration der Epithelfasern in der Haut.
Monatsheft f. prakt. Dermatol.
40, 492-495 (1905)

27. PETERSEN, H.: Färben mit Säurealizarinblau.
Z. wiss. Mikr. 41, 363-365 (1924)

28. QUINTARELLI, G., J. A. CIFONELLI and R. ZITO:
On phosphotungstic acid staining. II.
J. Histochem. Cytochem. 19, 648-653 (1971)

29. QUINTARELLI, G., M. BELLOCCI and R. GEREMIA:
On Phosphotungstic acid staining IV.
Selectivity of the staining reaction.
J. Histochem. Cytochem. 21, 155-160 (1973)

30. RATH, R.: Dispersionsbestimmungen mit Zeiss'schen Abbe-Refraktometern.
Neues Jahrbuch Mineral. Abh.
90, 1-6 (1957)

31. RAWITZ, B.: Neue Fixierungs- und Färbungsmethoden.
Z. wiss. Mikr. 25, 385-396 (1908)

32. RIBBERT, H.: Über die Anwendung der von Mallory für das Zentralnervensystem empfohlenen Farblösung auf andere Gewebe. Zbl. Path. 7, 427-429 (1896)

33. RINNE, F. und M. BEREK: Anleitung zur allgemeinen und Polarisations-Mikroskopie der Festkörper im Durchlicht. 3. Auflage Stuttgart: Schweizerbart 1973

34. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München - Wien 1968

35. SCHUENINOFF, S.: Eine neue Fibrintinktionsmethode. Zbl. Path. 19, 6-7 (1908)

36. SCOTT, J. E.: Phosphotungstate: A "universal" (nonspecific) precipitant for polar polymers in acid solution. J. Histochem. Cytochem. 19, 689-691 (1971)

37. SEKI, M.: Zur Physikalischen Chemie der histologischen Färbung. XI. Anwendung der Molybdän- und Wolframverbindungen. Z. Zellforsch. 24, 186-203 (1936)

38. SILVERMAN, L. and D. GLICK: The reactivity and staining of tissue proteins with phosphotungstic acid. J. Cell Biol. 40, 761-767 (1969)

39. SPANGENBERG, K.: Die Einbettungsmethode. Fortschr. Miner., Kristall. u. Petrogr. 7, 1-64 (1922)

40. SPECHT, W.: Neue Modifikation der Azanfärbung. Anat. An. 111, Erg.h., 392-393 (1963)

41. STOCK, V.: Vergleich visueller interferenzmikroskopischer Meßverfahren. Dissertation, Tübingen (1975)

42. VOLKMANN, R. v.: Über zwei Knorpel- und Knochenfärbungen mittels modifizierten Eisenhämatoxylins. Z. wiss. Mikr. 46, 385-390 (1930)

43. WALLART, I. und Ch. HOUETTE:
Eine rasche Dreifachfärbung durch Abänderung der Masson'schen Trichrom-Methode.
Anat. An. 69, 43-46 (1930)

44. WALTER, L.:
Neuartige Anwendung des Pasinischen Farbgemisches zur feineren Untersuchung des Bindegewebes.
Z. wiss. Mikr. 46, 457-464 (1929)

45. WUNDERLICH, H. E.: Wenn es um Gelatine geht.
Deutscher Gelatineverbraucherdienst, 61 Darmstadt, Holzhofallee 35 (1972)

46. WURMBACH, H.:
Modellversuch zur Bildung der Kollagenfeinstruktur des Knorpels.
Zool. Jahrbücher 69, 251-272 (1945)

47. ZEISS, C.:
Abbe-Refraktometer, Gebrauchsanweisung.
C. ZEISS, Oberkochen, Druckschrift G-50-112-d

48. ZEISS, C.:
Gebrauchsanleitung Abbe-Refraktometer Tafel 2.
Korrekturwerte U, s und V zur Dispersionsmessung durch Bestimmung der Brechungszahl bei verschiedenen Wellenlängen.
C. ZEISS, Oberkochen, Druckschrift T 50-112-2

49. ZEISS, C.:
Durchlicht-Interferenz-Mikroskopie.
C. ZEISS, Oberkochen, Druckschrift 40-560-d

50. ZEISS, C.:
SENARMONT-Kompensation $\lambda/4$
Drehbarer Glimmerkompensator $\lambda/4$.
Gebrauchsanleitung.
C. ZEISS, Oberkochen, Druckschrift G 41-510-d

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Wissenschaftliche Mikroskopie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Haselmann danke ich für die Überlassung des Themas und für die zahlreichen Ratschläge und freundlichen Hilfestellungen.

Besonders möchte ich auch Herrn Dipl.-Phys. J. Rienitz, Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Habermalz sowie Frau Bäuchle, Frl. Romberg und Frl. Schneider für ihre Hilfe bei dieser Arbeit danken.

## LEBENSLAUF

Am 22. Juni 1952 wurde ich, Eckhard Gilch, als Sohn des Dr. med. Theodor Gilch und seiner Ehefrau Waltraut, geb. Kümmel, in Albershausen geboren.

Nach vier Jahren Grundschule in Albershausen besuchte ich von 1963 bis 1971 das Freihof-Gymnasium in Göppingen. 1970 legte ich dort das kleine Latinum ab, 1971 die math.-naturwiss. Reifeprüfung.

Nach meinem Wehrdienst 1971 bis 1972 immatrikulierte ich mich für ein Semester an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen für die Fächerkombination Physik und Geographie, im 2. und 3. Hochschulsemester für Biologie. Ab dem Sommersemester 1974 studierte ich an der Universität Freiburg Medizin. Dort legte ich im Sommer 1975 das Physikum ab. Die ersten beiden klinischen Semester und die erste ärztliche Prüfung absolvierte ich an der Universität Bonn. Zum Wintersemester 1975/76 wechselte ich zur Universität Heidelberg, Klinikum Mannheim, über. Nach der zweiten ärztlichen Prüfung im März 1979 schloß ich mein Studium der Medizin mit der dritten ärztlichen Prüfung am 25. April 1980 in Mannheim ab.